

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LAS TAQUICININAS EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO

Programa 3.004 BIOTECNOLOGÍA

Antonio Jesús Cejudo Román

Directores: Luz Candelas de Luján; Francisco Pinto Pérez; Cristina González Ravina





Dña. Luz Cadenas de Luján, Doctora en Farmacia por la Universidad de Valencia y Científica Titular del Instituto de Investigaciones Químicas, Centro de Investigaciones Científicas Isla de La Cartuja,

CERTIFICA QUE:

El trabajo titulado "Caracterización de la expresión y función de las taquicininas en el espermatozoide humano ha sido realizado íntegramente por D. Antonio Jesús Cejudo Román bajo mi tutela y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un Tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Sevilla, a 24 de Mayo de 2017.


Fdo.: Luz Cadenas de Luján



MINISTERIO
DE ECONOMÍA, INDUSTRIA
Y COMPETITIVIDAD



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS



D. Francisco Pinto Pérez, Doctor en Biología por la Universidad de La Laguna y Científico Titular del Instituto de Investigaciones Químicas, Centro de Investigaciones Científicas Isla de La Cartuja,

CERTIFICA QUE:

El trabajo titulado "Caracterización de la expresión y función de las taquicininas en el espermatozoide humano ha sido realizado íntegramente por D. Antonio Jesús Cejudo Román bajo mi tutela y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un Tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Sevilla, a 24 de Mayo de 2017

Fdo.: Francisco Pinto Pérez



Dra. Dña. Cristina González Ravina, Doctora en Ciencias Químicas por la Universidad de Sevilla, Profesora de la Universidad Pablo de Olavide, Directora del Laboratorio de Andrología y Banco de Semen de IVI Sevilla y Coordinadora de los Laboratorios de Andrología del Grupo IVI.

CERTIFICA QUE:

El trabajo titulado "Caracterización de la expresión y función de las taquicininas en el espermatozoide humano", ha sido realizado íntegramente por D. Antonio Jesús Cejudo Román bajo mi tutela y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un Tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Sevilla, a 11 de mayo de 2017.

Fdo. Cristina González Ravina

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luz Candenás y al Dr. Francisco Pinto, científicos titulares del CSIC, por haber dirigido esta Tesis con la misma pasión con la que lo hacen todo, por haberme abierto el Laboratorio de Farmacología para que descubriera un mundo inmenso de oportunidades y de diversión, por las risas y por su amistad. Por enseñarme a amar la investigación y que sean un espejo donde reflejarse y por sus consejos y su paciencia conmigo en estos años. Siento que todo esto se haya demorado tanto. Siempre guardaré un lugar especial en mi corazón para vosotros.

A la Dra. Cristina González, directora del Laboratorio de Andrología de IVI Sevilla, por transmitirme su entusiasmo por el trabajo bien hecho, su amor por la Andrología y por la confianza depositada en mí durante la dirección de esta Tesis Doctoral. Por abrirme mil puertas y haber hecho todo esto posible y porque sé que siempre estaremos al otro lado de la extensión. Como bien dijiste: por fin ha llegado este momento.

Al Dr. Manuel Fernández, director de IVI Sevilla, por su decidida apuesta por la investigación.

Al Dr. Jon Irazusta, a la Dra. Nerea Subirán y al resto de componentes del Departamento de Fisiología de la Euskal Herriko Unibertsitatea, en especial al Dr. Gorka Larrinaga, a la Dra. Itxaro López, al Dr. Asier Valdivia y al Dr. Jon Torres, por su excelente acogida, por los momentos compartidos y por hacerme sentir como uno más en tierras bilbaínas.

Al Dr. Alberto Pacheco, director del Laboratorio de Andrología de IVI Madrid, por enseñarme los entresijos de la citometría de flujo y permitirme que pudiera desarrollar en su laboratorio parte de los experimentos que forman parte de este trabajo.

Al Dr. Nicolás Garrido, director de la Fundación IVI, por la confianza que depositó desde el principio en este chico del sur que se fue a Valencia a aprender sobre reproducción.

A la Dra. Teresa Acosta y al Dr. Mariano Hernández, del Instituto de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de la Universidad de La Laguna, por su esfuerzo e interés en el estudio de las taquicininas y su ayuda en la descripción en el tracto reproductor femenino.

Al Dr. Manuel Tena-Sempere por su ayuda en el análisis crítico de los estudios llevados a cabo con la kisspeptina.

Al Dr. Enrique Poblador por su ayuda en la obtención de las placentas.

Al Dr. Nicolás Prados, director del Laboratorio de FIV de IVI Sevilla, y a todo su equipo, en especial a Jordan García y a Carmen Martín por su colaboración para proporcionarme los líquidos foliculares de las punciones ováricas para que pudiera llevar a cabo los experimentos de quimiotaxis.

A mis niñas de Andrología de IVI Sevilla, a Teba de Ruz, Rocío Herrera, María del Mar Laynez, Patricia Campos, Rosario Ramos y María Rodríguez, por haber capacitado hasta la extenuación muestras de semen para mí y por aguantar mis llamadas a horas intempestivas para ir a recoger muestras o medios, independientemente del día de la semana que fuera. Muchas gracias, sin vuestro trabajo nada de lo que aquí se habla hubiera sido posible.

A Manuel David Gallardo y a David Martín, mis compañeros de batallas en el Laboratorio de Farmacología del Instituto de Investigaciones Químicas, por su amistad, su inestimable ayuda en la elaboración de los experimentos, y sobre todo, por la cantidad de momentos buenos que hemos pasado tanto dentro como fuera de ese laboratorio. Al Dr. Julián Parra, que aunque no fuera del Laboratorio, ha pasado grandes ratos allí conversando de las cosas más inverosímiles que podáis imaginar. A Ángela Palma, que aunque no llegamos a compartir tiempo en el IIQ, ayudó a sentar bases que después me ayudaron mucho en mi trabajo y hoy en día es mi compañera en IVI Málaga. Y por supuesto a los hermanos Mente Tieso: Absoluta y Completa.

Al resto del personal del IIQ, especialmente al Dr. Julio Martín, alma máter del Departamento de Química Biológica, al Dr. Ricardo Pérez, por su empeño en la caracterización lipídica de los espermatozoides, a la Dra. Natalia Pérez, por su inestimable ayuda en la puesta a punto de las sondas fluorescentes para el fluorímetro, a la Dra. Gloria Gutiérrez, por su amistad, sus consejos y su cariño, a Pablo Béjar, por tener siempre una sonrisa y estar dispuesto a realizar el más loco de los planes en todo momento, al Dr. Fran Manzano, por animar las tardes cuando más largas se hacían, a Ángeles por recibirnos cada mañana con la mejor de las sonrisas, y al personal de seguridad de CicCartuja, en especial a Luis Llopis y a Francisco Javier Ruiz, por aguantarme día tras día con el mayor de los cariños y la mayor de las paciencias.

A la Dra. Anabel Salazar, directora de IVI Málaga, por depositar su confianza en mí y contar conmigo para su equipo. A la Dra. Rocío Quiroga, directora del Laboratorio FIV y Andrología de IVI Málaga, por ser una jefa ejemplar, una buena amiga y hacer del laboratorio una gran familia. A mis compañeros del FIV, la plantilla fija y los que han ido pasando: Ana Higuero, Ángela Palma, Álvaro Jódar, Esther Santamaría y Víctor Romero; y a los que no son del FIV pero que pasaron de ser compañeros a ser amigos: Alfonso Bravo, José Alberto Gómez y Kadri Jaakson. Muchas gracias por aguantarme estos últimos meses.

A mi madre. Mamá, sin ti, nada de esto hubiera sido posible. Sin tu amor infinito por mis hermanas y por mí. Sin tu dedicación para que nos superáramos cada día. Sin tu valentía para que supiéramos defendernos en la vida como lo que tú eres, una luchadora nata. Sin tu confianza ciega en mí no hubiera podido ir dando los pasos que me han llevado hasta aquí. Gracias por ser la mejor madre del mundo.

A mis hermanas Anabel y María, por ser mis segundas madres. Por ayudarme siempre y en todo momento a conseguir los objetivos y a que no me viera nunca superado por las circunstancias. Por hacerme el niño más feliz del mundo cuando era pequeño. Siento si alguna vez os he fallado. Lo siento de verdad. Fui injusto cuando no debía serlo. Gracias por traerme a mi vida a mis dos cuñados y a esos cuatro sobrinos que hacen de cualquier reunión familiar el mejor de los planes. Os quiero con locura.

A mis amigos de toda la vida. Por aguantarme. Por soportarme. Por no tirarme por los bloques cuando había que hacerlo y por tirarme un salvavidas cuando había que hacerlo. A Domi por su fidelidad, por ser ese compañero de aventuras que te da la vida para que todo sea siempre más divertido. A Mayka por amar con locura a mi amigo Domi. A Javier por ser mi único primo sin necesidad de serlo, por su sentido del humor y por haberse leído esta Tesis buscando errores como si fuera suya. A Carmen por amar con locura a mi amigo Javier. A Adrián por ser el tío con el corazón más grande que conozco, por enseñarnos a vivir con pasión, por su espíritu de superación y por capacidad de lucha. A Davinia por amar con locura a mi amigo Adrián. A Nael por ser único, inimitable, inigualable, divertido, valiente, puro sentimiento y adictivo, porque siempre te quedas con ganas de más cuando estás con él. A Seila por amar con locura a mi amigo Nael, ser la madre de Vega y de Río y por haberme ayudado con el diseño de la portada y la maquetación de esta Tesis Doctoral. A Andrés y al Yoe, porque aunque nos veamos poco, siempre hay un momento del día o de la semana para sacarnos una sonrisa y porque cuando nos vemos, parece que el tiempo no ha pasado.

A ti, María, por abrirme a la vida. Por hacerme mejor persona cada día. Por descubrirme sentimientos que no conocía. Por enseñarme a disfrutar de cada momento que nos brinda la vida. Por tu sonrisa. Por ser tú en cada instante. Por hacerme reír con tus cosas. Por ser tan apasionada con la vida. Por hacerme sentir el hombre más afortunado del mundo a tu lado. Por enamorarme cada noche cuando miro en el otro lado del colchón y te veo. Por ayudarme a enseñar mis cicatrices. Por arrancarme las entrañas y mirarme más adentro donde solo vivo yo, sacarme esos miedos y tirarlos. Porque en los charcos saltaremos tú y yo. A Linda, la hija de cuatro patas que introdujiste en mi vida y que me enseñó que el amor verdadero es incondicional y que la bondad es la más bella de las virtudes. Adoro a mi familia.

LISTA DE ABREVIATURAS

8OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina

ABHD2: Proteína 2 que contiene un dominio hidrolasa α/β

ABP: Proteína de unión a andrógenos

ACR: Acrosina

ACTB: β -actina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AKAP: Proteínas de anclaje de la proteína quinasa A

AKT: Proteína quinasa B

AMPc: Adenosina monofosfato cíclica

APS: Persulfato amónico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosina trifosfato

CaM: Calmodulina

CaMKII: Quinasa II de calmodulina

CASA: Sistema computerizado de análisis de semen

Ca_v: Cánales iónicos de Ca^{2+} dependientes de voltaje

CGP: Células germinales primordiales

CTB: Subunidad B de la toxina colérica

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

EKA: Endocinina A

EKB: Endocinina B

EKC: Endocinina C

EKD: Endocinina D

ENaCs: Canales de sodio epiteliales

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

ESCRT: Complejos de ordenación endosómica necesarios para el transporte

DAB: Diaminobencidina

DAG: 1,2-diacilglicerol

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DHE: Dihidroxietidio

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

FF: Fluido folicular

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FITC-PNA: Lectina de *Arachis hypogaea* conjugada con isotiocianato de fluoresceína

FITC-PSA: Lectina de *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína

FSH: Hormona estimulante del folículo

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GDP: Guanosina difosfato

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

GMPC: Guanosina monofosfato cíclica

GTP: Guanosina trifosfato

hCG: Gonadotropina coriónica humana

HK-1: Hemocinina-1

Hv1: Canal de protones dependiente de voltaje

IP₃: Inositol-trifosfato

IP₃R: Receptores de inositol-trifosfato

LH: Hormona luteinizante

MAE: Membrana acrosomal externa

MAI: Membrana acrosomal interna

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

mHTF: Fluido tubal humano modificado

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NEP: Neprilisina

NEP2: Neprilisina II

NFkB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NKA: Neurocinina A

NKB: Neurocinina B

NPK: Neuropeptido K

NPγ: Neuropeptido γ

NSF: Factor sensible a N-etilmaleimida

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PC: Fosfatidilcolina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDE: Fosfodiesterasa

PE: Fosfatidiletanolamina

PFA: Paraformaldehído

PI3K: Fosfatidilinositol-3 quinasa

PIP2: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PS: Fosfatidilserina

PSer: Serina fosforilada

PThr: Treonina fosforilada

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

PY: Tirosina fosforilada

RNE: Envuelta nuclear redundante

RyR: Receptores de rianodina

SCA: Sperm Class Analyzer

SDS: Dodecilsulfato

SM: Esfingomielina

SNARE: Receptor de Proteína de fijación soluble de NSF

SP: Sustancia P

TdT: Transferasa deoxinucleotidil terminal

TEMED: Tetrametiletilendiamida

TK: Taquicinina

TRP: Potencial transitorio

TRPV1: Receptor de potencial transitorio vanilloide 1

TTBS: Tampón salino de Tris con Tween-20

TUNEL: TdT-mediated -dUtp nick end labeling

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1. PROCESO DE FORMACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE: ESPERMATOGÉNESIS	7
1.1. Células germinales primordiales y formación de la gónada masculina	7
1.2. Función del testículo adulto	8
1.3. Endocrinología de la espermatogénesis	10
2. BIOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE	12
2.1. Morfología del espermatozoide. Partes del espermatozoide	12
2.2. Movilidad activada	15
2.3. Capacitación	21
2.3.1. Reordenación lipídica de la membrana plasmática	24
2.3.2. Cambios en los flujos iónicos a través de la membrana plasmática	31
2.3.3. Aumento de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina	36
2.4. Quimiotaxis	38
2.5. Hiperactivación	42
2.6. Reacción acrosómica y fusión con el ovocito	46
2.7. Estrés oxidativo, fragmentación del ADN y apoptosis	56
3. SISTEMA TAQUICINÉRGICO	59
3.1. Taquicinas	61
3.2. Receptores taquicinérgicos	64
3.3. Mecanismos de transducción de señales intracelulares tras la activación de los receptores taquicinérgicos	67
3.4. Papel del sistema taquicinérgico en el control periférico de la reproducción	68

4.	SISTEMA DE LA KISSPEPTINA/KISS1R	70
4.1.	Kisspeptinas	70
4.2.	Receptor KISS1R	73
4.3.	Mecanismos de transducción de señales intracelulares tras la activación de KISS1R	74
4.4.	Papel del sistema KISS/KISS1R en el control central de la reproducción. Colocalización con la NKB en el núcleo arqueado	75
4.4.1.	Colocalización kisspeptina/NKB en las neuronas del núcleo arqueado	76
4.5.	Papel del sistema KISS/KISS1R en el control periférico de la reproducción	79
III.	METODOLOGÍA	83
1.	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	85
2.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SEMEN	86
3.	EXTRACCIÓN DE ARN Y RETROTRANSCRIPCIÓN A ADNc. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	87
3.1.	Extracción de ARN y retrotranscripción a ADNc	87
3.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	88
4.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y ANÁLISIS POR WESTERN BLOT	91
4.1.	Análisis de la expresión proteica de los receptores taquicinérgicos (NK ₁ , NK ₂ y NK ₃), de las enzimas degradadoras de las taquicinas (NEP y NEP2) y del receptor de la kisspeptina (KISS1R)	91
4.2.	Análisis de la fosforilación de las proteínas espermáticas en residuos de tirosina o en residuos de serina/treonina vía PKA o PKC	94
5.	INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA	96
6.	INMUNOHISTOQUÍMICA	99

7.	ESTUDIOS DE MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA	100
7.1.	Estudio de los efectos de las taquicininas sobre la movilidad espermática en presencia o ausencia de antagonistas de los receptores taquicinérgicos. Análisis de la hiperactivación	101
7.2.	Estudio de los efectos de las enzimas NEP y NEP2 sobre la movilidad espermática en presencia o ausencia de antagonistas de los receptores taquicinérgicos	104
7.3.	Estudio de los efectos de la kisspeptina sobre la movilidad espermática en presencia o ausencia de un antagonista del receptor de la kisspeptina. Análisis de la hiperactivación	105
8.	ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS TAQUICININAS SOBRE LA VITALIDAD ESPERMÁTICA	106
9.	CITOMETRÍA DE FLUJO	108
9.1.	Estudio de los efectos de las taquicininas sobre la fragmentación del ADN espermático	108
9.2.	Estudio de los efectos de las taquicininas sobre los procesos de apoptosis espermática	108
9.3.	Estudio de los efectos de las taquicininas sobre el estrés oxidativo espermático	109
9.4.	Estudio de capacitación espermática	110
10.	MEDIDAS DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Y Na^+ , $[\text{Na}^+]_i$ EN EL ESPERMATOZOIDE	112
10.1.	Estudio de los efectos de las taquicininas y la kisspeptina sobre los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$	112

10.2.	Estudio de los efectos de las taquicininas y la kisspeptina sobre los niveles de $[Na^+]_i$	113
11.	ESTUDIOS DE QUIMIOTAXIS	114
12.	ESTUDIOS DE REACCIÓN ACROSÓMICA	116
13.	ESTUDIOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS BALSAS LIPÍDICAS DURANTE LA REACCIÓN ACROSÓMICA	118
13.1.	Distribución de las balsas lipídicas, la sustancia P y la hemocinina-1 durante la reacción acrosómica	119
14.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	120
IV.	RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL	121
1.	EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS. IMPLICACIÓN EN LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA Y POSIBLES EFECTOS ADVERSOS DE SU ACTIVACIÓN	123
1.1.	Expresión génica de los receptores taquicinérgicos en los espermatozoides humanos	123
1.2.	Expresión y localización de los receptores taquicinérgicos en espermatozoides humanos	124
1.3.	Efecto de las taquicininas en la movilidad espermática humana	126
1.4.	Posibles efectos nocivos de la sustancia P en espermatozoides humanos: efectos sobre vitalidad, fragmentación, apoptosis y estrés oxidativo	134
2.	EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LAS TAQUICININAS Y SUS PRINCIPALES ENZIMAS DEGRADADORAS (NEP Y NEP2) EN TESTÍCULO, PLASMA SEMINAL Y ESPERMATOZOIDES HUMANOS. IMPLICACIÓN EN LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA	136

2.1.	Expresión génica de las taquicinas y de la NEP y la NEP2 en espermatozoides humanos	136
2.2.	Localización de las taquicinas en espermatozoides y testículo humano	137
2.3.	Expresión y localización de la NEP y la NEP2 en plasma seminal y espermatozoides humanos	140
2.4.	Efecto de la inhibición de la NEP y la NEP2 por fosforamidón en la movilidad espermática humana	143
3.	EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA KISSPEPTINA Y SU RECEPTOR EN TESTÍCULO Y ESPERMATOZOIDEOS HUMANOS. IMPLICACIÓN EN LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA	147
3.1.	Expresión y localización del receptor de la kisspeptina en los espermatozoides humanos	147
3.2.	Localización de la kisspeptina en espermatozoides y testículo humano. Colocalización con su receptor específico y con la neurocinina B	149
3.3.	Efecto de la kisspeptina en la movilidad espermática humana	152
4.	EFFECTOS DE LA SUSTANCIA P Y LA KISSPEPTINA SOBRE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA	158
4.1.	Efectos de la sustancia P y la kisspeptina sobre la concentración de Na^+ intracelular, $[\text{Na}^+]_i$	158
4.2.	Efectos de la sustancia P y la kisspeptina sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_i$	160
4.3.	Efectos de la sustancia P y la kisspeptina sobre la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina	162

4.4.	Efectos de la sustancia P sobre la fosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina a través de las rutas de PKA y PKC	168
5.	PAPEL DE LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS EN LA QUIMIOTAXIS INDUCIDA EN LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR EL FLUIDO FOLICULAR	173
6.	EFFECTOS DE LA SUSTANCIA P Y LA KISSPEPTINA SOBRE LA HIPERACTIVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS	174
7.	EFFECTOS DE LA SUSTANCIA P Y LA KISSPEPTINA SOBRE LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS	176
8.	LOCALIZACIÓN DE LA SUSTANCIA P Y LA HEMOCININA-1 EN LOS ESPERMATOZOIDES QUE HAN SUFRIDO LA REACCIÓN ACROSÓMICA	178
V.	DISCUSIÓN	181
1.	LOS RECEPTORES NK_1 , NK_2 Y NK_3 Y LAS TAQUICININAS ESTÁN PRESENTES EN EL ESPERMATOZOIDE Y EL TESTÍCULO HUMANO	183
2.	LAS TAQUICININAS PROVOCAN UN AUMENTO DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA Y DE LA FOSFORILACIÓN DE LOS RESIDUOS DE TIROSINA ASOCIADA A LA CAPACITACIÓN.	185
3.	LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS ESTÁN INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA QUIMIOTÁCTICA QUE EJERCE EL FLUIDO FOLICULAR SOBRE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS	189
4.	LAS PEPTIDASAS NEP Y NEP2 ESTÁN PRESENTES EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO. SU INHIBICIÓN PROVOCA UN AUMENTO DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA	191
5.	LA KISSPEPTINA Y SU RECEPTOR ESPECÍFICO KISS1R ESTÁN PRESENTES EN EL ESPERMATOZOIDE Y EL TESTÍCULO HUMANO	193

6.	LA KISSPEPTINA PRODUCE UN EFECTO BIFÁSICO SOBRE LA MOVILIDAD PROGRESIVA E INDUCE HIPERACTIVACIÓN EN LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS A TRAVÉS DE LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO	195
7.	LA NKB Y LA KISSPEPTINA COLOCALIZAN EN LA MISMA REGIÓN DEL ESPERMATOZOIDE	198
8.	INNOVACIONES TÉCNICAS: LA REACCIÓN ACROSÓMICA PUEDE SER DETECTADA A TRAVÉS DE LA UNIÓN DE LA TOXINA COLÉRICA AL GANGLIÓSIDO GM ₁ DE LAS BALSAS LIPÍDICAS	200
9.	POSIBLES APLICACIONES CLÍNICAS	202
VI.	CONCLUSIONES	203
VII.	BIBLIOGRAFÍA	207

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del desarrollo de la espermatogénesis en un túbulo seminífero.	10
Figura 2: Esquema de las partes del espermatozoide.	14
Figura 3: Micrografía electrónica del flagelo espermático de ratón.	15
Figura 4: Modelo de permeabilidad iónica y segundos mensajeros durante la capacitación espermática.	36
Figura 5: Modelo del comportamiento espermático ante un gradiente quimioatrayente.	42
Figura 6: Patrones de batido flagelar.	46
Figura 7: Respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ de los espermatozoides a agonistas fisiológicos de la reacción acrosómica.	49
Figura 8: Representación de la reacción acrosómica.	51
Figura 9: Esquema de los exones de los genes humanos que codifican para las TKs.	63
Figura 10: Esquema del receptor taquicinérgico NK ₂ .	65
Figura 11: Esquema del gen <i>KISS1</i> y de la generación de las kisspeptinas a partir de su transcripción.	72
Figura 12: Esquema del receptor KISS1R.	74
Figura 13: Cámara para realizar experimentos de quimiotaxis.	114
Figura 14: Análisis de la expresión de los ARNm de <i>TACR1</i> , <i>TACR2</i> , <i>TACR3</i> , <i>GAPDH</i> y <i>ACTB</i> en espermatozoides humanos.	124
Figura 15: Inmunodetección de los receptores NK ₁ , NK ₂ y NK ₃ en el espermatozoide humano.	125
Figura 16: Análisis de Western blot que demuestra la presencia de los tres receptores taquicinérgicos (NK ₁ , NK ₂ y NK ₃) en extractos proteicos de espermatozoides humanos.	126
Figura 17: Efectos de las taquicininas (TKs) sobre la movilidad progresiva de espermatozoides humanos tras 15 minutos de incubación.	128
Figura 18: Efecto de la SP (0,01 nM – 10 µM) sobre la movilidad espermática humana tras 15 minutos de incubación.	129

Figura 19: Curvas concentración-respuesta para la SP y la [MePhe ⁷]-NKB (0,01 nM – 10 µM, 15 minutos de incubación) en muestras de espermatozoides preincubadas durante 45 minutos con SR140333 (10 nM, antagonista selectivo del receptor NK ₁), SR48968 (10 nM, antagonista selectivo del receptor NK ₂), SR142801 (10 nM, antagonista selectivo del receptor NK ₃) o su correspondiente solvente (curvas control).	130
Figura 20: Efecto de la SP (1 µM) sobre los parámetros de velocidad de la movilidad espermática tras diversos tiempos de incubación.	132
Figura 21: Efecto de la SP (1 µM) sobre los índices de trayectoria de la movilidad espermática tras diversos tiempos de incubación.	133
Figura 22: Efecto de la SP (1 µM) sobre los parámetros amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, ALH, y frecuencia de batido flagelar, BCF, tras diversos tiempos de incubación.	134
Figura 23: Posibles efectos nocivos de la SP (1 µM) tras incubación de los espermatozoides con la TK a diversos tiempos.	135
Figura 24: Análisis de la expresión de los ARNm de <i>TAC1</i> , <i>TAC3</i> , <i>TAC4</i> , <i>MME</i> , <i>MMEL1</i> , <i>CD4</i> y <i>ACR</i> por PCR en espermatozoides humanos.	137
Figura 25: Localización por inmunofluorescencia de las taquicininas SP, NKA, NKB y HK-1 en espermatozoides humanos capacitados.	139
Figura 26: Localización de la SP y la HK-1 en cortes de testículo humano.	140
Figura 27: Localización por inmunofluorescencia de la NEP y la NEP2 en espermatozoides humanos capacitados.	141
Figura 28: Análisis mediante Western blot de la presencia de la NEP y la NEP2 en extractos proteicos de espermatozoides humanos y de plasma seminal.	142
Figura 29: Efectos del fosforamidón sobre la movilidad espermática humana tras diversos tiempos de incubación.	145
Figura 30: Efectos del fosforamidón sobre la movilidad espermática humana en ausencia o presencia del antagonista selectivo del receptor NK ₁ SR140333 (10 nM), del antagonista selectivo del receptor NK ₂ SR48968 (10 nM), del antagonista selectivo del receptor NK ₃ SR142801 (10 nM), de una combinación de los tres (cocktail) o de los solventes de dichos antagonistas.	146

Figura 31: Localización por inmunofluorescencia del receptor de la kisspeptina KISS1R en espermatozoides humanos capacitados.	148
Figura 32: Análisis mediante Western blot de la presencia de la KISS1R en extractos proteicos de espermatozoides humanos y de placenta.	148
Figura 33: Localización por inmunofluorescencia de la kisspeptina en espermatozoides humanos capacitados.	149
Figura 34: Colocalización por inmunofluorescencia de la kisspeptina y de KISS1R en espermatozoides humanos capacitados.	150
Figura 35: Colocalización por inmunofluorescencia de la kisspeptina y la NKB en espermatozoides humanos capacitados.	151
Figura 36: Localización de la kisspeptina en cortes de testículo humano.	152
Figura 37: Efectos de la kisspeptina sobre la movilidad espermática humana a diferentes tiempos de incubación.	154
Figura 38: Efecto de la kisspeptina (10 μ M) sobre los parámetros de velocidad de la movilidad espermática tras diversos tiempos de incubación.	155
Figura 39: Efecto de la kisspeptina (10 μ M) sobre los índices de trayectoria de la movilidad espermática tras diversos tiempos de incubación.	156
Figura 40: Efecto de la kisspeptina (10 μ M) sobre los parámetros amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, ALH, y frecuencia de batido flagelar, BCF, tras diversos tiempos de incubación.	157
Figura 41: Efecto de la SP (1 μ M) y de la kisspeptina (10 μ M) sobre los niveles de Na ⁺ intracelular en los espermatozoides humanos.	159
Figura 42: Efecto de la SP (1 μ M) y de la kisspeptina (10 μ M) sobre los niveles de Ca ²⁺ libre intracelular, [Ca ²⁺] _i , en los espermatozoides humanos analizados por espectrofluorimetría tras el marcaje con la sonda específica de Ca ²⁺ Fura-2.	161
Figura 43: Efecto de la SP (1 μ M) y de la progesterona (1 μ M) sobre los niveles de Ca ²⁺ libre intracelular, [Ca ²⁺] _i , en los espermatozoides humanos aislados utilizando la sonda Oregon Green.	162

Figura 44: Efecto de la incubación de espermatozoides en condiciones capacitantes sobre los niveles de fosforilación de residuos de tirosina. Los resultados se determinaron mediante citometría de flujo.	163
Figura 45: Efecto de la SP (1 μ M – 100 nM) sobre los niveles de fosforilación de residuos de tirosina a diversos tiempos de incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes. Los resultados se determinaron mediante citometría de flujo.	164
Figura 46: Efecto de la kisspeptina (10 μ M) sobre los niveles de fosforilación de residuos de tirosina a diversos tiempos de incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes. Los resultados se determinaron mediante citometría de flujo.	165
Figura 47: Efecto de la incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes sobre los niveles de fosforilación de proteínas en los residuos de tirosina a diversos tiempos. Los resultados fueron obtenidos mediante Western blot.	166
Figura 48: Efectos de la incubación de los espermatozoides con SP (1 μ M) en presencia de fosforamidón (F) (1 μ M) en condiciones capacitantes sobre los niveles de fosforilación de proteínas en los residuos de tirosina a diversos tiempos. Los resultados fueron obtenidos mediante Western blot.	167
Figura 49: Efecto de la incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes sobre los niveles de fosforilación de proteínas en los residuos de serina y treonina tras activación de la vía de la PKA a diversos tiempos. Los resultados fueron obtenidos mediante Western blot.	169
Figura 50: Efecto de la incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes sobre los niveles de fosforilación de proteínas en los residuos de serina y treonina tras activación de la vía de la PKC a diversos tiempos. Los resultados fueron obtenidos mediante Western blot.	170

Figura 51: Efectos de la incubación de los espermatozoides con SP (1 μ M) en presencia de fosforamidón (F) (1 μ M) en condiciones capacitantes sobre los niveles de fosforilación de proteínas en los residuos de serina y treonina tras activación de la vía de la PKA a diversos tiempos. Los resultados fueron obtenidos mediante Western blot.	171
Figura 52: Efectos de la incubación de los espermatozoides con SP (1 μ M) en presencia de fosforamidón (F) (1 μ M) en condiciones capacitantes sobre los niveles de fosforilación de proteínas en los residuos de serina y treonina tras activación de la vía de la PKC a diversos tiempos. Los resultados fueron obtenidos mediante Western blot.	172
Figura 53: Efecto de los antagonistas de los receptores taquicinérgicos (SR140333 100 nM, SR48968 100 nM, SB222200 1 μ M, 45 minutos) sobre el efecto quimioatrayente del líquido folicular en espermatozoides tras diferentes tiempos de exposición al mismo.	173
Figura 54: Efecto de la SP (1 μ M) y la kisspeptina (10 μ M) sobre la movilidad hiperactiva de los espermatozoides.	175
Figura 55: Efecto de la SP (1 μ M), la kisspeptina (10 μ M) y el ionóforo A23187 (10 μ M) sobre la reacción acrosómica en espermatozoides tras su capacitación durante 6 horas.	177
Figura 56: Estudio de la distribución de las balsas lipídicas en espermatozoides humanos previa y posteriormente a la reacción acrosómica espermática.	179
Figura 57: Micrografías de la distribución de las balsas lipídicas y las TKs SP y HK-1 durante la reacción acrosómica espermática inducida con ionóforo A23187.	180

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Genes y secuencias aminoacídicas de las TKs de mamíferos.	61
Tabla 2: Genes de los receptores de las TKs en humanos.	66
Tabla 3: Comparación de las secuencias de la kisspeptina-14 entre especies.	72
Tabla 4: Secuencias de los primers sentido y antisentido y tamaño esperado (en pb) de los productos de amplificación por PCR de los genes de estudio.	89
Tabla 5: Tampón utilizado para el desarrollo de la PCR.	90
Tabla 6: Tampón de urea para la extracción de proteínas.	91
Tabla 7: Composición de los geles resolutivos y empaquetadores para electroforesis de proteínas.	92
Tabla 8: Anticuerpos primarios y secundarios y diluciones utilizadas en los experimentos de Western blot.	94
Tabla 9: Anticuerpos primarios y secundarios y diluciones utilizadas en los experimentos de análisis de fosforilaciones por Western blot.	95
Tabla 10: Anticuerpos primarios y secundarios y diluciones utilizadas en los experimentos de inmunofluorescencia indirecta.	97
Tabla 11: Anticuerpos primarios y diluciones utilizadas en los experimentos de inmunohistoquímica.	99
Tabla 12: Configuración de los valores de análisis usados en el sistema SCA®.	100
Tabla 13: Clasificación de los espermatozoides por el tipo de movilidad según la OMS.	101
Tabla 14: Parámetros cinéticos de la movilidad espermática determinados por el sistema CASA.	103
Tabla 15: Efecto de las TKs sobre la movilidad espermática humana tras diversos tiempos de incubación.	127

I. RESUMEN



En nuestro país y, en general, en los países industrializados, los problemas de fertilidad son cada vez más frecuentes y actualmente se estima que entre un 15-20% de las parejas en edad reproductiva tienen problemas para concebir de manera natural. El factor masculino es responsable de aproximadamente el 40% de los casos de infertilidad.

Como consecuencia de este incremento en los niveles de infertilidad, en los últimos años se han producido avances muy importantes en la medicina reproductiva y se han desarrollado una gran variedad de técnicas de reproducción asistida, pero aún queda mucho camino por recorrer. En relación a la infertilidad masculina, la prueba inicial en las clínicas de reproducción asistida es el seminograma, que resulta de gran utilidad para el diagnóstico de problemas como la azoospermia, la teratozoospermia o la astenozoospermia, pero presenta limitaciones en otros aspectos de diferenciación de la calidad del semen entre varones fértiles y subfértiles. En este contexto, el estudio de la fisiología de todos los tipos celulares que intervienen en la función reproductiva es de vital importancia para identificar las causas de la creciente infertilidad y encontrar nuevas soluciones para este problema.

En el caso de los espermatozoides, tras la eyaculación y durante el período de tiempo que residen en el tracto genital femenino, sufren una serie de modificaciones morfológicas y funcionales que conducen a la capacitación, cambios en la motilidad, unión al ovocito y la reacción acrosómica. Estos cambios moleculares, imprescindibles para la formación de espermatozoides con capacidad de fecundar al ovocito, se inician en la superficie de la célula y se necesitan estudios más profundos para establecer la naturaleza precisa de los receptores y canales iónicos activados primaria y secuencialmente en la membrana plasmática.

El objetivo de la presente Tesis ha sido analizar la presencia y función del sistema de las taquicininas y la kisspeptina en el espermatozoide humano. Las taquicininas constituyen una familia de péptidos bioactivos cuyos principales miembros son la sustancia P (SP), la neurocinina A (NKA), la neurocinina B (NKB) y la hemocinina-1 (HK-1). Los efectos de estos péptidos en las células están mediados por receptores específicos de membrana, denominados NK₁, NK₂ y

NK₃, que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Las evidencias acumuladas durante los últimos años, tanto por otros grupos de investigación como por el nuestro, sugerían la implicación de las taquicininas en las funciones de reproducción, actuando tanto a nivel central (eje hipotálamo-hipofisario) como a nivel periférico, sobre el tracto reproductor. Estos datos han sido confirmados recientemente, al demostrarse la asociación entre el hipogonadismo hipogonadotrófico humano y la existencia de mutaciones en los genes que codifican la NKB y el receptor NK₃. A nivel hipotalámico, la NKB se expresa en la misma población de neuronas que la kisspeptina, un neuropéptido que, actuando sobre su receptor KISS1R, juega un papel crucial en el control de la reproducción, ya que regula la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y, por tanto, la liberación de las hormonas hipofisarias LH y FSH. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre los efectos de la kisspeptina a nivel periférico.

El descubrimiento de la presencia de las taquicininas y la kisspeptina en los espermatozoides de una forma funcionalmente activa supone un avance en el camino hacia la comprensión del comportamiento de un espermatozoide humano durante su viaje por el tracto femenino.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL



1. PROCESO DE FORMACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE: ESPERMATOGÉNESIS

1.1. CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES Y FORMACIÓN DE LA GÓNADA MASCULINA

La producción de los gametos haploides masculinos tiene lugar en el interior de los testículos en un proceso de diferenciación celular generado a partir de las CGP denominado espermatogénesis. Las CGP se forman durante el desarrollo embrionario temprano en la región posterior del epiblasto, justo en la zona de unión del ectodermo extraembrionario, el epiblasto, la línea primitiva y el alantoides (Clark y Eddy, 1975; Lawson et al., 1999; Ying et al., 2000). Desde este punto, migran directamente hacia el mesodermo intermedio ingresando en las crestas genitales donde se multiplican mitóticamente hasta colonizar las gónadas en desarrollo (Bendel-Stenzel et al., 2000; Hogan, 2002). Las porciones ventrales de los rudimentos de la gónada están formadas por el epitelio de la cresta genital, que prolifera hacia el tejido conectivo laxo mesenquimático formando los cordones sexuales. Es ahí donde migran las CGP, quedando rodeadas por estos cordones. Hasta este punto, el desarrollo gonadal y de migración de las CGP es idéntico en machos y hembras. Sin embargo, alrededor de la octava semana de desarrollo, si se activa el gen *SRY* del cromosoma Y masculino, estos cordones siguen proliferando y extendiéndose profundamente hasta formar una red de cordones sexuales internos denominada rete testis. Estos cordones, que ya podemos llamar cordones testiculares, pierden el contacto con el epitelio a partir del cual se originaron y se separan de éste por medio de una amplia matriz llamada túnica albugínea. En este momento, las CGP que han colonizado los cordones testiculares no podrán iniciar la meiosis que dará lugar a los futuros espermatozoides hasta la pubertad (Langman, 1981; McLaren y Southee, 1997; Gilbert, 2003). Durante este tiempo, las células del cordón se diferencian a células de Sertoli, que proporcionarán el sustento necesario para la espermatogénesis (ver apartado 1.3, Adams y McLaren, 2002). Al llegar a la pubertad, estos cordones se ahuecan para formar los túbulos seminíferos, donde finalmente se llevará a cabo la espermatogénesis. La luz de

todos los túbulos seminíferos de la rete testis desemboca en los conductos deferentes y en el epidídimo, que proviene del conducto de Wolff. Las células mesenquimáticas que quedan encerradas durante la formación del testículo se diferenciarán a células de Leydig, que juegan un papel esencial en el control endocrino de la espermatogénesis (Figura 1) (Dym, 1994).

1.2. FUNCIÓN DEL TESTÍCULO ADULTO

Las CGP, al llegar al testículo fetal, se dividen mitóticamente para formar las espermatogonias tipo A, las cuales se disponen sobre las células de Sertoli quedando íntimamente ligadas a la membrana basal de los túbulos seminíferos. Al entrar en la pubertad y producirse el aumento de producción de las hormonas gonadotrópicas, los testículos descienden del abdomen a la bolsa escrotal, donde se encontrarán a unos 34°C, temperatura adecuada para llevar a cabo la espermatogénesis. Este hecho se debe tanto a la localización extracorporal de las gónadas como a la función del plexo campaniforme, sistema vascular compuesto por una red de venas que enfrían la sangre al entrar en el escroto. Cualquier eventualidad que altere estas condiciones de temperatura, como puede ser el descenso tardío de los testículos o el varicocele (presencia de varices en las válvulas de estas venas), pueden producir infertilidad masculina. Bajo estas nuevas condiciones, las espermatogonias tipo A tienen dos comportamientos: dividirse formando nuevas espermatogonias tipo A, autorrenovando y manteniendo la población de células madre adultas; o diferenciarse en espermatogonias tipo B, que ya son competentes para entrar en meiosis. Previamente a la entrada en este proceso de reducción cromosómica, las espermatogonias tipo B sufren varias mitosis. Todos estos procesos, que constituyen la fase proliferativa de la espermatogénesis, se llevan a cabo en las cercanías de la membrana basal del túbulo seminífero, que es el lugar más rico en nutrientes de esta estructura testicular.

En el caso de las espermatogonias tipo B, tras la entrada en meiosis abandonan la membrana basal del túbulo seminífero y empiezan a adentrarse en el mismo atravesando la barrera hemato-testicular, formada por diversas uniones célula-célula entre proyecciones citoplasmáticas de células de Sertoli adyacentes (Johnson y Boekelheide, 2002). Esta barrera semipermeable impide que las células del sistema inmune entren en el lumen del túbulo seminífero, creando un

ambiente privilegiado desde el punto de vista inmunológico. Las espermatogonias tipo B que comienzan a realizar la primera división meiótica son denominadas espermatocitos primarios. Tras esta primera división, se originan un par de espermatocitos secundarios, que completan la segunda división meiótica, generándose cuatro células haploides que se denominan espermátidas (Figura 1). Hasta este punto, todas las divisiones que se han llevado a cabo, tanto mitóticas como meióticas, no sufren una citocinesis completa, sino que, en su lugar, todas las células forman un sincitio por el cual se comunican unas con otras a través de puentes citoplasmáticos (Dym y Fawcett, 1971). De este modo, las espermátidas son haploides pero son funcionalmente diploides ya que los productos génicos producidos por una célula difunden por estos puentes afectando a todas sus vecinas (Braun et al., 1989).

Tras la fase meiótica de la espermatogénesis, las espermátidas sufren una maduración morfológica y molecular muy compleja para convertirse en espermatozoides, en un proceso denominado espermiogénesis. Entre estas modificaciones destaca la construcción del acrosoma a partir del aparato de Golgi (Moreno et al., 2000), la formación del axonema espermático a partir del cual se generará el flagelo (Okó, 1998), la hipercondensación del material genético con sustitución de las histonas por protaminas, causando la paralización completa de la transcripción (Meistrich et al., 2003), la reorganización mitocondrial alrededor de la pieza media del futuro espermatozoide (Cataldo et al., 1996) y la eliminación del citoplasma sobrante del espermatozoide en forma de gota citoplasmática, que es reabsorbida por las células de Sertoli adyacentes (Okó et al., 1993). Este último suceso está relacionado con la liberación de los espermatozoides de las células de Sertoli, a las que han estado íntimamente ligados durante todo el proceso, dirigiéndose hacia la luz del túbulo seminífero, desde la cual llegarán hasta la rete testis (Guraya, 1995). Una vez liberados a la luz del túbulo, son conducidos hasta el epidídimo, donde seguirán madurando y adquiriendo características esenciales para adquirir la capacidad fecundante.

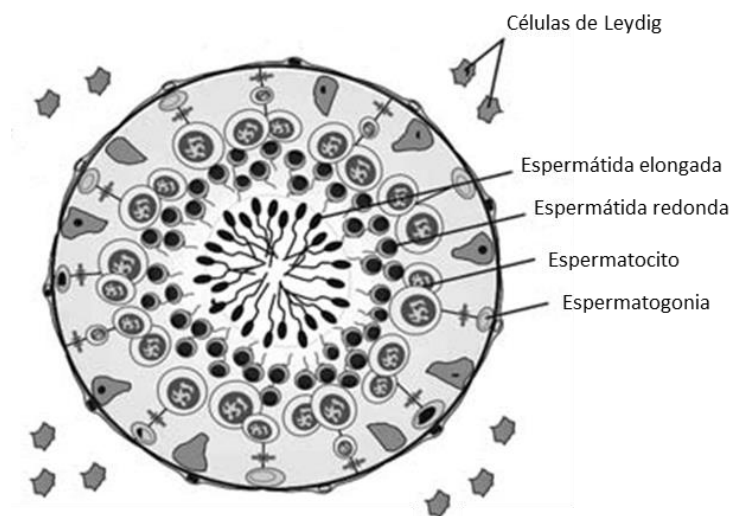


Figura 1: Esquema del desarrollo de la espermatogénesis en un tubo seminífero (modificado de Rolland et al., 2008).

1.3. ENDOCRINOLOGÍA DE LA ESPERMATOGÉNESIS

Una correcta espermatogénesis requiere una compleja interacción entre los elementos estructurales del testículo y el sistema endocrino. La puesta en marcha y el subsiguiente mantenimiento de la función testicular depende de la adecuada regulación del eje hipotálamo-hipofisario a través de la adecuada secreción pulsátil de la GnRH por parte del hipotálamo, que a su vez determina la liberación pulsátil de las gonadotropinas hipofisarias, FSH y LH, hacia el torrente sanguíneo, desde donde alcanzan el testículo. En los hombres, el receptor de FSH se expresa en las células de Sertoli (Rannikki et al., 1995) mientras que el receptor de LH lo hace en las células de Leydig (Lei et al., 2001). La acción de la FSH sobre las células de Sertoli hace que éstas produzcan numerosas proteínas clave para la espermatogénesis, principalmente la ABP (Tindall et al., 1978). De manera complementaria, la LH actúa sobre las células de Leydig provocando en ellas la síntesis de testosterona a partir del colesterol (Waterman y Keeney, 1992). La testosterona es liberada al torrente sanguíneo para que llegue a sus órganos y células diana, principalmente las células de Sertoli, donde la síntesis de ABP gracias a la FSH provoca una elevada concentración de testosterona intratubular indispensable para llevar a cabo la espermatogénesis (Varma et al.,

1988). De todos modos, aún no están del todo claros los mecanismos de actuación de la interacción testosterona-ABP en las células de Sertoli que se traducen en una correcta espermatogénesis (McLachlan, 2000; Holdcraft y Braun, 2004).

El testículo por su parte, ejerce una retroalimentación negativa sobre la producción de FSH y LH. Este mecanismo de regulación negativa tiene como diana principal el hipotálamo, pero no actúa directamente sobre las neuronas productoras de GnRH, sino sobre otros grupos neuronales sensibles a hormonas esteroideas que proyectan sobre las neuronas secretoras pulsátiles de GnRH (Swerdlow et al., 1992). Además, existe un regulador negativo producido en el testículo y que actúa a nivel hipofisario, la inhibina B (Anawalt et al., 1996).

Las deficiencias en el eje hipotálamo-hipofisario que conducen a deficiencias en la liberación de FSH y LH, y en consecuencia a bajos niveles de testosterona y a deficiencias en la espermatogénesis se engloban en una patología llamada hipogonadismo hipogonadotrofo. Este síndrome puede tener numerosos orígenes: anatómico, funcional, genético o idiopático (Spratt et al., 1987). Estos desórdenes se pueden tratar con la administración de hCG (Vicari et al., 1992) o de FSH (Jockenhövel et al., 1990).

2. BIOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE

2.1. MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE. PARTES DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula altamente especializada y por ello tiene una elevada polarización, presentando dos partes claramente diferenciadas: la cabeza y la cola (Figura 2). Ambas zonas están unidas mediante el cuello, sitio de articulación entre la cabeza y la cola que contiene los centriolos espermáticos y la pieza de conexión. Durante la espermatogénesis el centriolo distal origina el axonema del flagelo mientras que el centriolo proximal migra hasta el polo caudal del núcleo, uniéndose a él. Alrededor del par de centriolos se ensambla una estructura muy compleja, la pieza de conexión, formada por un cilindro de proteínas densas de nueve columnas longitudinales de tubulina cerradas por el capitulum, que se articula con el núcleo espermático (Figura 3) (Chemes et al., 1999; Chemes y Álvarez-Sedo, 2012).

Cabeza

La cabeza contiene tanto las estructuras necesarias para atravesar las capas de células y de glicoproteínas que rodean al ovocito como el material genético que dará lugar al pronúcleo masculino del futuro embrión. Para ello, presenta una polarización funcional, ya que en su extremo más apical encontramos una gran vesícula llamada acrosoma y en la región posterior aparece el núcleo haploide. Ambos componentes se encuentran rodeados por un escaso citoplasma.

- Acrosoma: organela subcelular repleta de enzimas líticas y de proteínas de unión a la zona pelúcida del ovocito (Okabe, 2013). La exocitosis de esta vesícula, proceso conocido como reacción acrosómica, se produce en las inmediaciones del ovocito para favorecer la penetración del espermatozoide a través de las células de la granulosa que lo rodean y la unión a la zona pelúcida y es un paso esencial y necesario para que se produzca una correcta fecundación (Jamil y White, 1981; Harper et al., 2006; Harper et al., 2008; Yanagimachi, 2011).

- **Núcleo:** localizado en la región post-acrosomal, se encuentra envuelto por la membrana nuclear y contiene el ADN haploide del espermatozoide altamente empaquetado para minimizar el espacio que ocupa. Este hecho se produce gracias a la sustitución de histonas por protaminas (Rathke et al., 2014). El alto grado de empaquetamiento del material genético espermático implica que son células en las que no se produce transcripción ni traducción y que los espermatozoides deben llegar a cumplir el objetivo de la fecundación del ovocito sin renovación de las proteínas sintetizadas durante la espermatogénesis. Sin embargo, determinados estudios han puesto de manifiesto que los espermatozoides poseen un remanente de ARNm en su interior, cuya función no está aún definida, aunque hay indicios que apuntan a que pudieran ser traducidos en ribosomas mitocondriales o citoplasmáticos (Wykes et al., 1997; Ostermeier et al., 2004; Gur y Breitbart, 2006; García-Herrero et al., 2010; Capallo-Obermann et al., 2011).

La cabeza espermática está rodeada por una membrana plasmática con numerosos microdominios, siendo importante destacar la existencia de un segmento ecuatorial que separa acrosoma y núcleo y que es esencial para el reconocimiento del ovocito.

Cola

La cola o flagelo tiene todas las estructuras necesarias para otorgar movilidad al espermatozoide. Se divide en tres partes:

- **Pieza media:** está formada por el axonema y por la extensión proximal de las nueve columnas de fibras densas que constituyen la pieza de conexión rodeada de mitocondrias. Las 22-75 mitocondrias que se mantienen en el espermatozoide y no son eliminadas en los cuerpos residuales durante la espermiogénesis se anclan a estructuras tubulares helicoidales que se disponen en el exterior de las nueve fibras densas (Figura 3) (Otani et al., 1988; Ho y Wey, 2007; Amaral et al., 2013). Esta es una de las fuentes de ATP que

proporciona la energía necesaria para que el espermatozoide pueda moverse (Ferramosca y Zara, 2014).

- Pieza principal: es el segmento más largo de la cola, la extensión del axonema rodeada a su vez de dos columnas de fibras membranosas (Figura 3). Esta estructura de $9 + 2$ está unida a una multitud de proteínas conformando una red proteica. De entre todas ellas, las más importantes son las dineínas, que son ATPasas que usan la energía química de la ruptura del ATP generado en la pieza media para provocar el deslizamiento entre microtúbulos y dineína. Esto produce el batido flagelar que da lugar al movimiento ondulatorio característico del espermatozoide (Inaba, 2003). Asociada a las fibras membranosas del flagelo se ha descrito la presencia de una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa específica de espermatozoides capaz de obtener ATP a través de la vía glicolítica (Bunch et al., 1998; Miki et al., 2004).
- Pieza final: corresponde a la última fracción, muy corta, de la cola, constituida solo por el axonema.

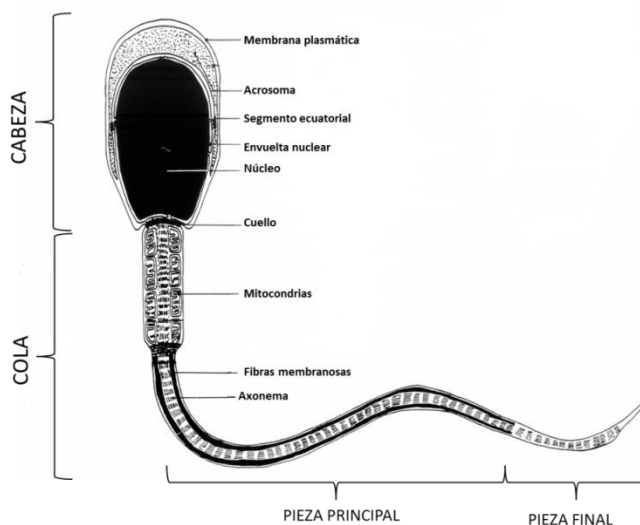


Figura 2: Esquema de las partes del espermatozoide (modificado de Gadella et al., 2008).

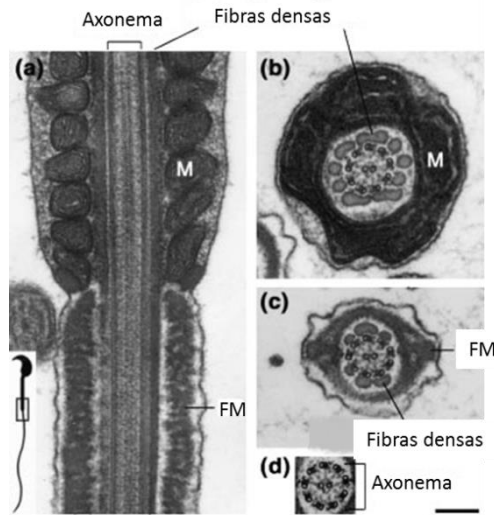


Figura 3: Micrografía electrónica del flagelo espermático de ratón (modificado de Ho y Suárez, 2001a). **(A)** Sección longitudinal de la inserción de la pieza media y la pieza principal donde se visualiza el axonema en el núcleo del flagelo. **(B)** Sección transversal de la pieza media donde el axonema está rodeado de las fibras densas y mitocondrias (M). **(C)** Sección transversal de la pieza principal del flagelo donde el axonema está rodeado de las fibras membranosas (FM). **(D)** Sección transversal del axonema. Barra: 200 nm.

2.2. MOVILIDAD ACTIVADA

Dentro del epidídimo humano, los espermatozoides son inmóviles, no porque el fluido sea muy viscoso (Turner y Reich, 1985), sino por la concentración de los diferentes iones en el medio, que se traduce, entre otras cosas, en un pH bajo (Carr et al., 1985). La movilidad de los espermatozoides se activa, una vez son eyaculados en el interior del tracto reproductor femenino, en determinados fluidos fisiológicos o en medios de cultivo específicamente diseñados. Aun así, los espermatozoides obtenidos de biopsias testiculares llegan a ser móviles tras una adecuada incubación *in vitro* (Emiliani et al., 2000).

La movilidad activada observada en un eyaculado se caracteriza por un batido flagelar simétrico y de baja amplitud de onda que hace que el espermatozoide adquiera una trayectoria más o menos rectilínea en un medio poco viscoso como es el plasma seminal, lo que le permite avanzar en su largo

camino por el tracto reproductor femenino (Darszon et al., 2006a; Turner, 2006). Los espermatozoides que carecen de esta movilidad son incapaces de alcanzar la unión útero-tubal del aparato reproductor femenino y, por tanto, de lograr una fecundación *in vivo* (Gaddum-Rosse, 1981). Este tipo de movilidad activada es diferente de la movilidad hiperactiva que desarrollan posteriormente los espermatozoides y de la que hablaremos más adelante.

Los estudios de la movilidad espermática se han llevado a cabo a través de dos estrategias:

1. Los sistemas computerizados de análisis de semen, también llamados CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer). La videomicrografía a alta velocidad ha ayudado a cuantificar determinados parámetros como el porcentaje de espermatozoides móviles, la frecuencia de batido flagelar o la amplitud de la onda descrita por el flagelo durante su movimiento. La mayoría de estos sistemas desarrollados para estudiar la movilidad de los espermatozoides de mamíferos están diseñados para seguir el movimiento de la cabeza y no del flagelo. Es por ello que muchos de los parámetros que se analizan, como la velocidad lineal y curvilínea, la linealidad de la trayectoria o la amplitud del desplazamiento de la cabeza, están más relacionados con la trayectoria celular que con el desarrollo de la actividad flagelar. Aun así, la información que podemos obtener de la movilidad espermática con estos sistemas es muy valiosa (Mortimer, 2000).
2. La eliminación parcial de la membrana plasmática de los espermatozoides con un detergente, normalmente Tritón X-100. Este modelo experimental permite sortear la impermeabilidad de la membrana plasmática, por lo que la adición de inhibidores, activadores o segundos mensajeros que puedan estar involucrados en la movilidad espermática tendrán acceso directo al axonema flagelar (Brokaw, 1975; De Lamirande y Gagnon, 1989). Con esta metodología se puso de manifiesto el papel de determinadas proteínas del axonema en el mantenimiento de la movilidad gracias al uso de determinados anticuerpos específicos que podían acceder hasta sus correspondientes

epítomos bloqueando su función (Gagnon et al., 1994; Gagnon et al., 1996; Gingras et al., 1996; Gingras et al., 1998).

Uno de los iones más importantes para que el espermatozoide comience a moverse es el ion HCO_3^- (Okamura et al., 1985; Garty y Salomon, 1987). Los espermatozoides de ratón procedentes del epidídimo caudal tienen una baja movilidad ya que están rodeados de un medio carente de HCO_3^- . La adición de HCO_3^- a estos espermatozoides induce un rápido incremento en la frecuencia del batido flagelar (Si y Okuno, 1999; Wennemuth et al., 2003a). La concentración de HCO_3^- es baja en el epidídimo, en torno a 3 mM, mientras en los fluidos corporales, como los que se encontrarán los espermatozoides en el tracto reproductor femenino es más elevada, alrededor de 30 mM (Levine y Marsh, 1971; Rodríguez-Martínez et al., 1990). A nivel celular, el HCO_3^- facilita la apertura de canales Ca_v y activa de forma directa a la adenil ciclase soluble atípica espermática (Chen et al., 2000; Wennemuth et al., 2000; Wuttke et al., 2001; Jaiswal y Conti, 2003; Litvin et al., 2003). El resultado es el aumento intracelular de AMPc y Ca^{2+} , los mensajeros secundarios más importantes en el inicio y mantenimiento de la movilidad espermática.

La influencia del Ca^{2+} en la movilidad espermática se pone de manifiesto en experimentos con espermatozoides demembrados que se exponen a concentraciones crecientes de dicho ion. Se observa cómo la frecuencia de batido flagelar va aumentando con el aumento de concentración de Ca^{2+} , pero concentraciones muy altas de dicho ion inhiben la movilidad del flagelo (Brokaw, 1979; Tash y Means, 1983). El aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede originarse por la liberación del mismo desde los depósitos intracelulares donde se almacena o a partir de la apertura de determinados canales de Ca^{2+} que permiten la entrada del Ca^{2+} extracelular. Varios Ca_v se localizan en los espermatozoides y su actividad se ha evidenciado en células espermátogénicas tardías y en los propios espermatozoides maduros (Benoff, 1998; Wennemuth et al., 2000). Por ejemplo, $\text{Ca}_v1.2$, 2.1 y 2.3 se localizan en la pieza proximal del flagelo (Westenbroek y Babcock, 1999), al igual que la subunidad auxiliar β_3 (Serrano et al., 1999). Sin embargo, los ratones knockout para el gen $\text{Ca}_v2.3$ son fértiles (Sakata et al., 2002). Además, otras tres subunidades Ca_v3 tipo T se sitúan en el flagelo en espermatozoides de ratón y humano (Treviño et al., 2004). También se han encontrado en el flagelo espermático determinados canales de Ca^{2+} que se abren

en respuesta a nucleótidos cíclicos, principalmente GMPc (Wiesner et al., 1998) y algunos canales de potencial transitorio (TRP) que pueden ser responsables de la entrada de Ca^{2+} extracelular, indispensable para la activación y mantenimiento de la movilidad espermática (Castellano et al., 2003). De todos modos, los canales de Ca^{2+} más importantes en el espermatozoide son los que pertenecen a la familia de los CatSper (CatSper 1-4), pero su función parece ser más importante en la movilidad hiperactiva que en la activa (Qi et al., 2007).

Como hemos comentado anteriormente, el AMPc se origina tras la activación de la adenil ciclasa soluble atípica espermática (Espósito et al., 2004; Hess et al., 2005). A pesar de su nombre, parece que una parte de esta enzima presente en el espermatozoide está asociada a la membrana y localizada en determinados microdominios discretos del flagelo (Hess et al., 2005). Aunque la adenil ciclasa del espermatozoide tiene muchas similitudes con la descrita en testículo, ya que es una modificación postraducciona de la misma que se activa también por HCO_3^- (Buck et al., 1999), y presenta una actividad 20 veces mayor en presencia de Mn^{2+} que en presencia de Mg^{2+} , característica de la adenil ciclasa soluble, no podemos descartar el papel de la adenil ciclasa transmembrana en el aumento de la concentración intracelular del AMPc, ya que en espermatozoides de mamíferos encontramos nueve de sus isoformas, siendo los isoformas 2, 3 y 8 los que mayor señal presentan por inmunofluorescencia. Su actividad también se ha puesto de manifiesto con el aumento de la producción de AMPc en espermatozoides tratados con forskolina y fluoruro, agonistas de la adenil ciclasa transmembrana (Baxendale y Fraser, 2003; Fraser et al., 2005; Wertheimer et al., 2013). Además, dicha actividad está regulada por receptores acoplados a proteínas G, como los receptores de adenosina o de calcitonina, entre otros (Adeoya-Osiguwa y Fraser, 2002; Adeoya-Osiguwa y Fraser, 2003; Adeoya-Osiguwa et al., 2006; Spehr et al., 2006). Del mismo modo, en los espermatozoides se han encontrado subunidades G_α tanto inhibitoras como estimuladoras de la adenil ciclasa transmembrana (Fraser et al., 2003; Spehr et al., 2004). A pesar de todo ello, los ratones knockout para la adenil ciclasa soluble que solo dispondrían de la adenil ciclasa transmembrana no producen AMPc en sus espermatozoides. Este hecho no descarta la posible función de la adenil ciclasa transmembrana en espermatozoides ya que puede que su activación necesite de algunos eventos anteriores que sean dependientes de la

creación de AMPc por parte de la adenil ciclasa soluble dependiente de HCO_3^- (Xie et al., 2006).

La acción del AMPc en la movilidad de los espermatozoides se debe a la activación de la PKA dependiente de AMPc. La PKA es una quinasa compuesta por dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas que transfiere grupos fosfato terminales del ATP a residuos de serina y treonina de los sustratos proteicos, regulando la activación o inhibición de los mismos. Es por ello que en espermatozoides demembrados, la movilidad se reactiva al añadir AMPc y ATP (San Agustín y Witman, 1994). Del mismo modo, el uso de H89, inhibidor de la PKA, bloquea la acción del AMPc sobre la movilidad espermática (Holt y Harrison, 2002; Wennemuth et al., 2003a). Además, en ratones, la delección del isoformo específico de espermatozoide de la subunidad catalítica C de la PKA que se expresa en el espermatozoide provoca problemas de fertilidad relacionados con una baja movilidad espermática (Skalhegg et al., 2002). La PKA en espermatozoides solo se localiza en el flagelo (Baker et al., 2013; Wertheimer et al., 2013). Las subunidades reguladoras I y II de la misma aparecen en las fibras membranosas de los espermatozoides de mamíferos (Vijayaraghavan et al., 1997a; Vijayaraghavan et al., 1997b) junto con la subunidad catalítica, que también aparece unida a las fibras densas externas (Moos et al., 1998). Esta compartimentalización se consigue gracias a las AKAP (Johnson et al., 1997). La unión PKA-AKAP es indispensable para el desarrollo de la movilidad espermática, como se demuestra con determinados péptidos sintéticos, como S-Ht31, que bloquean esta unión y también la movilidad de los espermatozoides (Vijayaraghavan et al., 1997a). Por tanto, las dianas que fosforila la PKA espermática en residuos de serina y treonina se encuentran principalmente en el flagelo. Entre ellas destacan múltiples quinasas de residuos de tirosina, que se activarán y fosforilarán en estos residuos a otras proteínas del flagelo relacionadas con la movilidad (Leclerc et al., 1996). La PKA también fosforila proteínas directamente implicadas en la movilidad, como la dineína del axonema (Tash et al., 1986; Tash, 1989; Tash y Bracho, 1998; Fujinoki et al., 2003; Fujinoki et al., 2004; Harrison, 2004). Aun así, no se ha realizado la identificación de todas las proteínas fosforiladas por la PKA espermática dependiente de AMPc e, igualmente, sus respectivas funciones no están del todo descritas.

La cinética de la respuesta de la adenil ciclasa espermática al HCO_3^- es extremadamente rápida. El AMPc alcanza su máximo a los 60 segundos de ser activada y el incremento en la fosforilación de proteínas dependiente de PKA comienza a los 90 segundos (Harrison y Miller, 2000; Harrison, 2004). Los niveles de AMPc caen tras el pico inicial y vuelven a subir más lentamente aproximadamente a los 7 minutos de la activación inicial de la adenil ciclasa. Las fosforilaciones dependientes de PKA siguen un curso temporal similar. Este tipo de respuesta al HCO_3^- en dos pulsos puede deberse a un mecanismo de retroalimentación en el que la PKA fosforile y active a las enzimas responsables de degradar el AMPc, las PDEs, modulando de este modo su actividad (Hanoune y Defer, 2001; Mehats et al., 2002). Sin embargo, la segunda oleada de AMPc parece no estar regulada de este modo y presenta una cinética de respuesta mantenida al HCO_3^- . El AMPc disponible es un reflejo del balance entre el AMPc sintetizado por las ciclasas y su rotura metabólica en 5'-AMP por la acción de las PDEs. Con el uso de anticuerpos específicos se han identificado en espermatozoides de ratón las PDE 1, 4, 6, 8, 10 y 11. La PDE 1A se encuentra principalmente en el flagelo, la PDE 11A en la región acrosomal y las PDE 4A y 10A en ambas regiones (Baxendale y Fraser, 2005). Determinados estudios farmacológicos han demostrado que las PDEs son funcionales en el espermatozoide. El uso de inhibidores de la PDE 1 estimula la reacción acrosómica y causa un aumento de los niveles de AMPc. El uso de inhibidores de la PDE 4 provoca también un incremento de los niveles de AMPc y una aceleración de la capacitación (Fisch et al., 1998; Lefievre et al., 2002; Baxendale y Fraser, 2005).

No solo la PKA está directamente implicada en el inicio y mantenimiento de la movilidad espermática, sino que otras quinasas también participan en la regulación de esta función. Por ejemplo, la PKC se localiza en el segmento ecuatorial y en la pieza principal del flagelo y al ser activada con forbol acetato miristato se produce un aumento de movilidad, mientras que la esfingosina, la estaurosporina o el H-7 bloquean esta ruta y a su vez la movilidad espermática (Rotem et al., 1990a; White et al., 2007). Determinados elementos de la ruta de señalización de la ERK también están presentes en los espermatozoides y parecen estar involucrados en la adquisición de la movilidad espermática (Lu et al., 1999).

Las fosfatasa de serina y treonina equilibran la acción de las quinasas de serina y treonina. Determinados inhibidores de las proteínas fosfatasa, como la caliculina o el ácido okadaico, potencian el efecto de aumento de movilidad del AMPc (Leclerc et al., 1996). La proteína fosfatasa tipo 1 γ 2 es una de las más importantes ya que se encuentra en altos niveles en muestras de espermatozoides inmóviles de primates y su inhibición específica provoca el inicio de la movilidad de los espermatozoides epididimarios bovinos (Smith et al., 1996; Vijayaraghavan et al., 1996). Además, la actividad de esta fosfatasa 1 γ 2 desciende durante la maduración en el epidídimo, a la vez que aumenta progresivamente la movilidad de los espermatozoides (Huang y Vijayaraghavan, 2004).

Por último, la eliminación de determinados factores presentes en el plasma seminal es esencial para la activación de la movilidad en espermatozoides. La presencia de Zn²⁺ a nivel flagelar se relaciona negativamente con la movilidad espermática humana (Henkel et al., 2003; Eickhoff et al., 2004). Las semenogelinas I y II son las principales proteínas presentes en los coágulos del semen humano recién eyaculado y representan el 20% de las proteínas del plasma seminal (Robert y Gagnon, 1999). Tras la eyaculación, estas proteínas son degradadas rápidamente por el antígeno específico prostático, una proteasa similar a las quimi tripsinas. La acción de esta enzima es inhibida por el Zn²⁺ (Jonsson et al., 2005). La adición *in vitro* de semenogelina inhibe la movilidad espermática (Robert y Gagnon, 1999). La presencia de inmunosupresores como los proteasomas, de poliaminas como la espermina y la espermidina y del factor de crecimiento transformante β en el plasma seminal tienen papeles relacionados con la protección de la movilidad del espermatozoide (Kelly, 1999).

2.3. CAPACITACIÓN

En el año 1951, Austin (1951) y Chang (1951) describen de manera simultánea en ratas y conejos que la introducción de una suspensión espermática en el tracto reproductor de las hembras en los momentos periovulatorios no era capaz de producir la fecundación de los ovocitos. Sin embargo, si estas suspensiones se depositaban varias horas antes, la mayoría de los ovocitos recuperados estaban fecundados. Al año siguiente, Austin (1952)

acuña el término capacitación para describir este fenómeno. Tras la eyaculación, los espermatozoides adquieren movilidad pero son incapaces de fecundar un ovocito. Es durante su migración por el tracto femenino cuando los espermatozoides sufren una serie de cambios bioquímicos que les permite llegar hasta los alrededores del ovocito, desencadenar la reacción acrosómica, penetrar la zona pelúcida ovocitaria y fusionar su membrana con la del gameto femenino. Hay que considerar a la capacitación como un proceso madurativo, de activación, de pérdida de factores protectores y, sobre todo, un proceso de selección dentro de la población de espermatozoides eyaculados, ya que, de los millones de espermatozoides de un eyaculado, solo unos pocos serán capaces de llegar a las inmediaciones del ovocito en óptimas condiciones para fecundarlo. De ahí que la población espermática de un eyaculado sea tan heterogénea y solo una parte de ella sea capaz de llevar a cabo de manera completa la capacitación (Gadella y Visconti, 2006). Por lo tanto, el propósito principal de la capacitación es asegurar que los espermatozoides lleguen al ovocito en el momento y en las condiciones adecuadas para que se desencadenen los mecanismos propios de la fecundación en el sitio preciso (De Lamirande et al., 1997). Muchos autores definen la capacitación como la capacidad de respuesta de los espermatozoides a determinadas sustancias capaces de inducir la reacción acrosómica como la progesterona (Shi y Roldan, 1995; Kirkman-Brown et al., 2002; Bedu-Addo et al., 2005), la glicoproteína de la zona pelúcida ZP3 (Breil y Wassarman, 1983; Aitken et al., 1995) o el ionóforo A23187 (Bielfeld et al., 1991; Aitken et al., 1993). El tiempo necesario para que un espermatozoide esté completamente capacitado y plenamente fértil es específico para cada especie (Fraser, 2010).

A pesar del tiempo transcurrido desde que se descubrieron los primeros indicios de la capacitación, las bases moleculares implicadas en este proceso siguen sin estar bien definidas. Sin embargo, las estrategias para simular la capacitación *in vitro* en medios tamponados definidos que simulan los contenidos en nutrientes y electrolitos del oviducto, sí que están perfectamente desarrolladas en diversos modelos animales y en humanos (Toyoda et al., 1971; Bavister, 1973; Yanagimachi, 1982; Neill y Olds-Clarke, 1987; Parrish et al., 1988; Wolf et al., 1989; Burkman, 1990; Suárez et al., 1992; Vandervoort et al., 1994; Young y Bodt, 1994). En muchos casos, estos medios capacitantes contienen como nutrientes glucosa, lactato y piruvato, un aceptor del colesterol

como la albúmina, NaHCO_3 , Ca^{2+} , baja concentración de K^+ y concentraciones de Na^+ similares a las fisiológicas (Visconti et al., 2002). Aunque los espermatozoides de muchas especies de mamíferos pueden adquirir una correcta capacitación y lograr una fecundación *in vitro*, estas condiciones no simulan por completo a las que se encuentra el espermatozoide en el tracto reproductor femenino, ya que los medios de cultivo no proveen al espermatozoide de un ambiente celular donde pueda esperar al ovocito en un estado de preparación adecuado ni impiden que se produzca una reacción acrosómica espontánea cuando llevan demasiado tiempo en esas condiciones capacitantes (DasGupta et al., 1994; Fraser et al., 1995; Funahashi et al., 2000; Adeoya-Osiguwa y Fraser, 2002). Del mismo modo, los diferentes medios comerciales empleados en la práctica clínica aceleran determinados aspectos moleculares relacionados con la capacitación respecto a medios capacitantes más simples y de composición completamente conocida (Moseley et al., 2005). Por estos motivos, las conclusiones extraídas de la capacitación *in vitro* deben ser validadas *in vivo*, donde el control hormonal del tracto reproductor femenino puede modificar la respuesta de los espermatozoides. De hecho, en varios mamíferos se han puesto a punto modelos para analizar la capacitación *in vivo* (Suárez et al., 1983; Hunter, 1987; Smith et al., 1987; Demott y Suárez, 1992). Con estos diseños, podemos seguir el transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductor femenino para posteriormente analizar las modificaciones de los mismos, pero son costosos y difíciles de hacer, ya que el número de espermatozoides que alcanzan el oviducto y posteriormente el sitio de fecundación es bajo, impidiendo realizar medidas cuantitativas de determinados parámetros bioquímicos. Además, por razones éticas, no se pueden llevar a cabo en humanos (Barratt y Cooke, 1991; De Lamirande et al., 1997). De todos modos, se han aislado determinados factores del oviducto que son capaces por sí solos de promover la capacitación *in vitro*, principalmente glicoproteínas (McCauley et al., 2003; Killian, 2004).

Los mecanismos moleculares implicados en la capacitación del espermatozoide son básicamente tres:

1. Reordenación lipídica de la membrana plasmática
2. Cambios en los flujos iónicos a través de la membrana plasmática que conducen a una hiperpolarización de la misma y

a variaciones en la concentración intracelular de determinados iones

3. Aumento de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina

La activación de todos estos procesos es dependiente de HCO_3^- (Boatman y Robbins, 1991) mediante la ruta de activación de la PKA por AMPc, por lo que podemos decir que, en parte, los mecanismos que influyen en la adquisición de la movilidad tras la eyaculación son los mismos que conducen al espermatozoide a conseguir una correcta capacitación (De Lamirande et al., 1997; Visconti et al., 2002; Gadella y Visconti, 2006; Fraser, 2010; Aitken y Nixon, 2013). La entrada de HCO_3^- al interior del espermatozoide no está bien definida, aunque parece que el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ puede ser el principal responsable ya que es una entrada electrogénica, dependiente de Na^+ y bloqueada por inhibidores de transportadores aniónicos (Romero y Boron, 1999; Demarco et al., 2003). Como dijimos en el apartado anterior, el ion HCO_3^- estimula la adenil ciclasa soluble provocando un aumento de AMPc en el interior del espermatozoide, aunque no se puede descartar la acción de la adenil ciclasa transmembrana regulada por receptores acoplados a proteínas G. Probablemente, la adenil ciclasa transmembrana, al estar bajo el control de subunidades G_α inhibitoras y estimuladoras dependientes de una amplia gama de mensajeros primarios con afinidad por múltiples receptores de membrana acoplados a proteína G, ejerza un control sobre la capacitación del espermatozoide impidiendo que éste sufra una reacción acrosómica espontánea (Fraser, 2010).

2.3.1. REORDENACIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

El modelo de mosaico fluido descrito por Singer y Nicolson (1972) establece que las membranas celulares se organizan como una bicapa de fosfolípidos anfipáticos donde sus partes hidrofóbicas (las cadenas acílicas) se colocan de manera enfrentada unas frente a otras y las partes hidrofílicas (las cabezas de los grupos fosfato) se colocan hacia el exterior, tanto hacia la cara extracelular como a la cara citoplasmática. Los componentes lipídicos no se encuentran dispuestos de manera azarosa en las dos capas que componen la bicapa lipídica, sino que siguen una distribución asimétrica, donde los aminofosfolípidos PS y PE se localizan fundamentalmente en la bicapa interna y la PC y la SM se encuentran principalmente en la bicapa externa (Verkleij et al.,

1973; Gadella et al, 2008). El colesterol también es una molécula anfipática, donde el grupo hidroxilo libre es la parte hidrofílica y el esqueleto esteroideo es la parte hidrofóbica, y aparece en ambas monocapas (Chapman, 1975). En condiciones normales, la asimetría en la composición de la membrana plasmática se mantiene gracias a la acción de tres transferasas de fosfolípidos: la transferasa de aminofosfolípidos llamada flipasa, que mueve la PS y la PE de la membrana externa a la interna, la transferasa de fosfolípidos no específica llamada flopasa, que mueve fosfolípidos de la membrana interna a la externa, y un transportador bidireccional llamado escramblasa, que mueve los cuatro fosfolípidos en ambas direcciones a través de la membrana plasmática (Harrison y Gadella, 2005; Gadella y Visconti, 2006). La gran mayoría de los fosfolípidos y del colesterol son capaces de moverse y difundir sobre la superficie de la membrana. Esta difusión lateral depende del contenido molecular de las cabezas de los fosfolípidos y de la composición y longitud de sus cadenas acílicas, así como de la cantidad de colesterol total presente en la membrana. Del mismo modo, hay determinadas fracciones fosfolipídicas inmovilizadas en la membrana por su unión al citoesqueleto o a la matriz extracelular. El modelo de mosaico fluido incluye que las proteínas intrínsecas de membrana, siempre que no tengan algún tipo de restricción, también son capaces de difundir sobre la superficie de la membrana, aunque su velocidad de difusión es menor que la de los componentes lipídicos de la misma (Cherry, 1979; Gadella et al., 2008).

La membrana plasmática del espermatozoide presenta una serie de particularidades que le otorgan unas características especiales frente al resto de membranas biológicas provocando que la difusión lateral de fosfolípidos y proteínas no sea completamente libre. En su composición hay una menor cantidad de colesterol respecto a las membranas de las células somáticas y las cadenas de ácidos grasos que presentan sus fosfolípidos son principalmente 22:6, 22:5 y 16:0, lo que le otorga una mayor heterogeneidad (Brouwers et al., 1998; Flesch y Gadella, 2000). Además, la casi completa ausencia de citoplasma hace que la membrana plasmática se encuentre en contacto directo con diversas estructuras intracelulares. Así, la membrana de la región post-acrosomal está en contacto con la envoltura nuclear, la de la región acrosomal con la membrana externa del acrosoma, la de la pieza media con las mitocondrias y la de la pieza principal con las fibras densas externas (Gadella et al., 2008). Por otro lado, el

intercambio de componentes de la membrana entre cabeza, pieza media y pieza principal del flagelo no es completamente libre entre las diferentes partes del espermatozoide. Del mismo modo, la región anterior de la cabeza presenta tres subregiones: el segmento ecuatorial, la región preecuatorial y el extremo apical; entre las que no se observa difusión lipídica ni proteica (De Leeuw et al., 1990). La descripción de diferentes densidades y de determinados agrupamientos en la membrana de estas tres subregiones, acompañado de la observación mediante fluorescencia de la difusión libre dentro de cada subregión, demuestra que estas subdivisiones pueden tener un carácter funcional y pone de manifiesto el carácter compartimentalizado de esta célula tan especializada (Suzuki y Yanagimachi, 1989; Wolfe et al., 1998; Bruckbauer et al., 2007). Sin embargo, en los espermatozoides de mamíferos si se ha detectado la presencia y actividad de las tres transferasas de fosfolípidos: flipasa, flopasa y escramblasa (Müller et al., 1994; Nolan et al., 1995; Gadella et al., 1999). Un correcto funcionamiento de estas enzimas es fundamental para que el espermatozoide desarrolle todas sus funciones en el momento adecuado. Los ratones knockout para la flipasa específica de espermatozoides presentan externalización de la PS antes de que se inicie la capacitación, lo cual se traduce en una baja tasa de penetración de la zona pelúcida y en una baja tasa de reacción acrosómica, ya que la membrana se vuelve más vulnerable a los cambios que debe afrontar en el interior del tracto reproductor femenino (Wang et al., 2004).

Las características que otorgan a la membrana espermática las mayores particularidades funcionales y diferenciales son los cambios que sufre durante la capacitación. Estas modificaciones, que afectan la arquitectura de la membrana plasmática espermática, se pueden dividir en dos tipos: los cambios rápidos y los cambios lentos (Gadella y Visconti, 2006).

Los acontecimientos tempranos que ocurren en la reorganización de la membrana plasmática asociados a la capacitación están mediados por el ion HCO_3^- . Los niveles fisiológicos de concentración de este ion inducen cambios en la asimetría fosfolipídica de la membrana. Estos cambios se han visualizado con la sonda fluorescente merocianina, que se intercala en la membrana cuando los fosfolípidos se mueven entre las membranas interna y externa y funciona como marcador de la fluidez de la membrana, y también con análogos fluorescentes de los distintos fosfolípidos (Harrison et al., 1996; Gadella y Harrison, 2000; Cross,

2003). Los experimentos realizados con merocianina han demostrado la velocidad de los cambios en la asimetría fosfolípida espermática ya que a los dos minutos de incubar espermatozoides con una concentración de HCO_3^- de 15 mM a 38°C pH 7,4 y una atmósfera al 5% de CO_2 , los espermatozoides comenzaban a adquirir fluorescencia. El marcaje máximo se alcanzaba a los 5 minutos. Por otro lado, la externalización de PE es máxima a los 20 minutos de dicha exposición y la de la PS es algo más tardía (Harrison y Gadella, 2005). El marcaje de la merocianina se observa por toda la superficie del espermatozoide, con especial presencia en la pieza principal del flagelo, la pieza media y la región postacrosomal. La externalización de la PE y la PS se produce principalmente en la región apical de la cabeza (Wolf et al., 1986; Flesch et al., 2001; Mackie et al., 2001; Rathi et al., 2001). Este hecho puede deberse a dos motivos: a una mayor proporción de estos dos fosfolípidos en esta subregión o a una mayor actividad local de la escramblasa (Harrison y Gadella, 2005). El análisis de los movimientos de los fosfolípidos sugiere que este cambio en la asimetría dependiente de HCO_3^- , que es independiente de Ca^{2+} y sólo tiene lugar a temperaturas fisiológicas (Harrison y Gadella, 2005) se produce por un incremento de la actividad de la escramblasa (Gadella y Harrison, 2000), mediado por la PKA, potenciado por inhibidores de las fosfatasa y reversible, al menos en parte (Harrison et al., 1996; Gadella y Harrison, 2000; Harrison y Miller, 2000). Todos estos experimentos se han desarrollado en el jabalí, sin embargo, resultados similares se han obtenido en los espermatozoides humanos, donde estos fenómenos también son dependientes de la ruta HCO_3^- -AMPc-PKA (De Vries et al., 2003).

Los cambios tardíos de la reorganización lipídica de la membrana plasmática que ocurren durante la capacitación están relacionados con el colesterol (Davis et al., 1979; Go y Wolf, 1985; Langlais et al. 1988; Travis y Kopf, 2002). El colesterol limita la permeabilidad iónica, la inserción de proteínas y la movilidad de los fosfolípidos en las membranas, haciéndolas más rígidas y estables (Parks y Ehrenwald, 1990). El principal efecto que tiene el cambio de asimetría de la membrana plasmática por el aumento de la actividad de la escramblasa es facilitar la extracción de colesterol y de otros esteroides, como el desmosterol, por medio de algún aceptor de los mismos (Flesch et al., 2001) y no al revés (Visconti et al., 1999a; Visconti et al., 1999b; Visconti et al., 2002). Es por ello que los medios de cultivo empleados para simular la capacitación *in vitro*

están suplementados con albúmina, para que secuestre el colesterol de la membrana de los espermatozoides durante la capacitación (Davis et al., 1980; Yanagimachi, 1994; Fraser, 2010), aunque su presencia no es indispensable para todas las especies (Choi et al., 2003). Se ha demostrado que en estos medios suplementados con albúmina hay un descenso en la capacitación de los espermatozoides cuando se añade colesterol exógeno. Este hecho se reduce si tras la adición del colesterol, se añade un exceso de albúmina (Visconti et al., 1999b). Del mismo modo, el efecto de la albúmina sobre los espermatozoides en capacitación no se produce si la albúmina ha sido tratada previamente con colesterol o con ácidos grasos (Go y Wolf, 1985). Curiosamente, la albúmina en espermatozoides no es capaz de movilizar los ácidos grasos de la membrana plasmática de los espermatozoides, algo que sí ocurre en otros tipos celulares (Flesch et al., 2001). Aunque el componente más usado en los medios de cultivo es la albúmina, se ha demostrado que otros aceptores de colesterol, como las lipoproteínas de alta densidad (Therien et al., 1997; Visconti et al., 1999b) o las β -ciclodextrinas a concentraciones bajas (inferiores a 1 mM) inducen efectos similares (Choi y Toyoda, 1998; Cross, 1999; Osheroff et al., 1999; Visconti et al., 1999a; Kato et al., 2010). *In vivo*, los aceptores de colesterol provienen de los fluidos del tracto reproductor femenino, ya que éstos derivan principalmente del suero (Visconti et al., 2002). Los procesos relacionados con el colesterol tienen lugar en dos pasos. En primer lugar, sin la presencia de albúmina o algún otro aceptor de colesterol ni de HCO_3^- , el colesterol se localiza tanto en la región acrosomal como en la postacrosomal de la cabeza del espermatozoide. Cuando se ponen estas células en contacto con el HCO_3^- , la región postacrosomal lo pierde y el colesterol se concentra en la región apical de la cabeza. Tras la adición de albúmina al medio, la mayoría de los espermatozoides que habían mostrado respuesta al HCO_3^- dejan de mostrar señal para el colesterol en toda la cabeza (Flesch et al., 2001; Gadella y Harrison, 2002; De Vries et al., 2003). Aunque queda bastante claro que la salida de colesterol de la membrana es un proceso posterior a los cambios en la asimetría de la membrana lipídica por la actividad principalmente de la escramblasa, esta salida puede provocar un aumento del efecto del HCO_3^- , que conduciría a una segunda oleada de aumento de AMPc mucho más sostenida en el tiempo y probablemente responsable de los procesos tardíos asociados a la capacitación (Gadella y Visconti, 2006), correlacionándose este hecho íntimamente con el descrito anteriormente para la relación del AMPc

con la movilidad activada. Por otro lado, la salida de colesterol de la membrana puede ser dependiente de la creación de radicales libres, ya que puede ser bloqueada por agentes antioxidantes lipofílicos como la vitamina A y la vitamina E (Brouwers et al., 2011; Boerke et al., 2013). En contraposición, hay algunos estudios que describen la acción de un transportador de esteroides reverso en los espermatozoides que se encargaría de elevar tanto el colesterol como el desmosterol de la bicapa lipídica para que la albúmina o cualquier otro aceptor los capte (Ban et al., 2005; Byrne et al., 2012; Morales et al., 2012). El hecho de que las β -ciclodextrinas a concentraciones altas (alrededor de 5 mM), además de eliminar el colesterol de la membrana, provoquen un deterioro en los espermatozoides puede deberse a un exceso de eliminación de colesterol de la membrana o al hecho de que las β -ciclodextrinas no necesiten ninguna enzima previa que les haga accesible el colesterol, como parece que sí ocurre con la albúmina. Probablemente, las β -ciclodextrinas sean capaces de extraer el colesterol incluso de las membranas de los espermatozoides que no han dado respuesta al HCO_3^- (Van Gestel et al., 2005a; Gadella y Luna, 2014). Un hecho a tener en cuenta es que aproximadamente el 6% del colesterol estabilizado en la membrana espermática se encuentra sulfatado, lo cual otorga mayor rigidez a la membrana. En el tracto reproductor femenino, las sulfatasas de esteroides hidrolizan este grupo incrementando el porcentaje de colesterol disponible para la esterificación por ácidos grasos procedentes de los fosfolípidos sometidos a la acción enzimática de la fosfolipasa A. Se generan así lisofosfolípidos que incrementan la fluidez de la membrana (Langlais et al., 1981; Roberts, 1987; Sion et al., 2001). Finalmente, todos estos cambios conducen a un descenso del ratio colesterol/fosfolípidos relacionado con la capacitación porque aumenta la fluidez de la membrana (Hoshi et al., 1990).

El estudio de la reestructuración lipídica de la membrana durante la capacitación se ha relanzado tras el descubrimiento de los “lipid rafts” o balsas lipídicas en espermatozoides. Estas estructuras, descritas por primera vez en ratón (Treviño et al., 2001), son pequeños dominios enriquecidos en esfingolípidos y esteroides con un alto dinamismo y heterogeneidad que son capaces de compartimentalizar distintos procesos celulares gracias a su capacidad para reclutar de forma selectiva a determinadas proteínas de membrana (Pike, 2006; Boerke et al., 2008; Nixon et al., 2011). Estos dominios

lipídicos se pueden aislar mediante la digestión celular con detergentes de bajo potencial iónico, como Tritón X-100 a bajas temperaturas, ya que no se disuelven en estas condiciones. Estas fracciones resistentes a detergentes se encuentran unidas a determinadas proteínas características de las balsas lipídicas, como la caveolina o la flotilina (Van Gestel et al., 2005b; Boerke et al., 2008). Ambas proteínas han sido localizadas tanto en espermatozoides como en fracciones resistentes a detergentes extraídas de espermatozoides (Travis et al., 2001; Cross, 2004; Nixon et al., 2011). Del mismo modo, la visualización de las balsas lipídicas en espermatozoides se puede realizar aprovechando la afinidad que presenta la CTB por el gangliósido GM₁, uno de sus principales esfingolípidos (Buttke et al., 2006; Watanabe y Kondoh, 2011). El análisis de las proteínas asociadas a las balsas lipídicas revela que la mayoría de ellas están relacionadas con el reconocimiento espermatozoide-ovocito (Nixon et al., 2008; Nixon et al., 2011). En este sentido, las fracciones resistentes a detergentes extraídas de los espermatozoides presentan por sí mismas la capacidad de unirse a la zona pelúcida ovocitaria (Bou Khalil et al., 2006). Existe una paradoja en cuanto al funcionamiento de las balsas lipídicas en las membranas plasmáticas, ya que si se asocian a proteínas de reconocimiento ovocitario, deben estar presentes en los estadios finales de la capacitación, donde la salida de colesterol de la membrana, uno de los principales componentes de estas estructuras, es muy acusada (Sleight et al., 2005). Este hecho ocurre porque la salida de colesterol de la membrana no es total y la concentración del colesterol restante en las balsas lipídicas es muy elevada para dar la mayor estabilidad a estos microdominios funcionales (Shadan et al., 2004). Del mismo modo, se han realizado estudios para analizar si la distribución de las balsas lipídicas en el espermatozoide es dependiente de la capacitación. Tras muchas controversias, diversos estudios concluyen que estas estructuras lipídicas parecen concentrarse en torno a la región periacrosomal cuando se produce la capacitación, tanto de forma fisiológica como inducida por β -ciclodextrinas (Cross, 2004; Van Gestel et al., 2005b; Buttke et al., 2006; Selvaraj et al., 2006; Selvaraj et al., 2007; Boerke et al., 2008; Nixon et al., 2011; Watanabe y Kondoh, 2011).

2.3.2. CAMBIOS EN LOS FLUJOS IÓNICOS A TRAVÉS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

El papel de los flujos iónicos en la regulación de la función espermática es muy amplio, afectando no solo a la capacitación sino también a la movilidad, a la expresión de determinados segundos mensajeros intracelulares y a la reacción acrosómica (Figura 4) (Darszon et al., 2006a). Los estudios realizados en ausencia de determinados iones y/o con activadores y/o bloqueantes selectivos de diferentes grupos de canales iónicos así lo ponen de manifiesto (Zeng et al., 1995; Florman et al., 1998; Arnoult et al., 1999; Félix et al., 2003).

La capacitación del espermatozoide va acompañada por una hiperpolarización de la membrana que se caracteriza por un aumento de cargas negativas intracelulares en comparación con el medio extracelular. Los medios no capacitantes y los capacitantes, tanto naturales como artificiales, presentan diferentes concentraciones iónicas a las que el espermatozoide debe reaccionar hiperpolarizando su membrana. En los medios capacitantes encontramos una mayor concentración de Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} y HCO_3^- y menor de K^+ (Yanagimashi, 1994). El control del movimiento de estos iones a través de la membrana mediante la acción selectiva de determinados grupos de canales iónicos son los que conducen a que se produzca dicha hiperpolarización. Este hecho no se puede producir en ausencia de albúmina y/o de HCO_3^- (Demarco et al., 2003). El potencial de membrana en reposo de los espermatozoides no capacitados oscila entre los -35 y los -45 mV. Sin embargo, en los espermatozoides capacitados, el potencial de membrana alcanza los -65 mV (Espinosa y Darszon, 1995; Demarco et al., 2003; De la Vega-Beltrán et al., 2012). Aunque los mecanismos moleculares que conducen a esta hiperpolarización no están del todo definidos, parece ser que la entrada de K^+ en el espermatozoide a través de determinados canales como SLO3 (también llamado KSper) pueden estar en la base de este procedimiento, como demuestran los experimentos realizados en ratones knockout para el gen *Slo3* (Muñoz-Garay et al., 2001; Acevedo et al., 2006; Navarro et al., 2007; Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011; Chávez et al., 2013). En los espermatozoides tratados con inhibidores de SLO3 o generados en ratones knockout para este canal no se observa hiperpolarización (Chávez et al., 2013; Sánchez-Carranza et al., 2015). Secundariamente y con menor importancia,

también puede estar involucrado en la hiperpolarización de la membrana espermática el bloqueo de la entrada de Na^+ a través de los canales ENaCs, sensibles a amilorida, con la mediación del regulador transmembrana de la fibrosis quística (Hernández-González et al., 2006; Hernández-González et al., 2007; Escoffier et al., 2012). Los espermatozoides de ratones knockout para *Slo3* son capaces de sufrir una hiperpolarización de la membrana plasmática en presencia de amilorida, demostrando el papel de los ENaCs (Chávez et al., 2013). Solo una parte de los espermatozoides bajo condiciones capacitantes son capaces de sufrir la hiperpolarización de la membrana. Se ha demostrado que en una suspensión de espermatozoides capacitados se pueden definir dos subpoblaciones en función de su potencial de membrana. Encontramos una subpoblación de espermatozoides con un potencial de membrana de -35 mV, similar a los espermatozoides no capacitados, y otra con un potencial de membrana de aproximadamente -80 mV, muy cercano al potencial de equilibrio del K^+ (Arnoult et al., 1999; Escoffier et al., 2015). En un principio se postuló la hipótesis de que la hiperpolarización era necesaria para la activación de los canales T de Ca^{2+} dependientes de voltaje, como Ca_v3 , necesario para llevar a cabo correctamente la reacción acrosómica inducida por agonistas (Arnoult et al., 1999). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que solamente la hiperpolarización de la membrana plasmática es necesaria para que se realice correctamente la reacción acrosómica (De la Vega-Beltrán et al., 2012).

Otro suceso iónico que caracteriza la capacitación es la alcalinización intracelular del espermatozoide (Darszon et al., 2006a; Visconti et al., 2011; Lishko et al., 2012). Como hemos comentado, en condiciones no capacitantes, la concentración de Na^+ y HCO_3^- en el medio es muy baja, y se eleva en condiciones capacitantes. Esto provoca, por un lado, la activación del intercambiador Na^+/H^+ , que incorpora Na^+ al espacio intracelular mientras expulsa del mismo iones H^+ (García y Meizel, 1999; Woo et al., 2002). De hecho, se ha descrito un intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoides que se localiza en la pieza principal del flagelo y regula la acción de la adenil ciclasa. Los ratones knockout para este intercambiador son completamente infértiles (Wang et al., 2007). Recientemente se ha descrito el canal Hv1 de extrusión unidireccional de protones y localizado en la pieza principal del flagelo (Lishko et al., 2010). Su localización no es casual puesto que el flagelo es la parte del espermatozoide

donde mayor acidificación se produce tras la hidrólisis del ATP. La acción de esta bomba extruyendo protones, que es más rápida que la de los intercambiadores descritos anteriormente, es dependiente del gradiente de pH y de la despolarización de la membrana (Kirichok y Lishko, 2011). Además, también se activa en ausencia de Zn^{2+} (Lishko et al., 2010; Lishko y Kirichok, 2010). El plasma seminal tiene una alta concentración de Zn^{2+} que inhibe la acción de Hv1. A lo largo del tracto reproductor femenino, este Zn^{2+} desaparece y puede actuar sobre Hv1 un endocannabinoide sintetizado por las células de la granulosa como la anandamida, potenciando su función (Lishko et al., 2010).

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ también se eleva durante la capacitación espermática, acelerando probablemente los efectos del HCO_3^- sobre la adenil ciclasa (Dasgupta et al., 1993; Jaiswal y Conti, 2003; Carlson et al., 2007; Visconti et al., 2011). El mantenimiento del gradiente de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática del espermatozoide lo lleva a cabo una bomba ATPasa que extruye Ca^{2+} llamada PMCA4. Los ratones knockout para esta bomba son infértiles (Okunade et al., 2004; Schuh et al., 2004). Sin embargo, la entrada de Ca^{2+} asociada a la capacitación debe ser muy rápida para contrarrestar la acción de esta ATPasa, y es por eso que se produce a través de canales iónicos (Lishko et al., 2012). Hay diversos canales de Ca^{2+} implicados en la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Darszon et al., 2011).

1. CatSpers: Mediante estudios bioinformáticos de análisis de secuencias se ha puesto de manifiesto la existencia de cuatro canales de Ca^{2+} específicos de espermatozoides que han recibido el nombre de CatSpers1-4, todos ellos localizados en la pieza principal del flagelo (Ren et al., 2001; Quill et al., 2001; Lobley et al., 2003). Tanto los ratones knockout como las mutaciones detectadas en estos canales en humanos originan infertilidad, lo cual pone de manifiesto la importancia de los mismos en la fisiología espermática (Avidan et al., 2003; Qi et al., 2007; Hildebrand et al., 2010). Los CatSpers son canales constitutivamente activos, levemente dependientes de voltaje, selectivos para el Ca^{2+} y altamente dependientes de la alcalinización intracelular (Kirichok et al., 2006; Ren y Xia, 2010). Este último hecho puede deberse a la presencia de un

dominio intracelular C-terminal rico en histidinas en CatSper1 (Visconti et al., 2011). Diversos estudios bioquímicos han demostrado que los CatSper1-4 se asocian en un complejo heteromérico de subunidades α formando un poro selectivo para el Ca^{2+} (Navarro et al., 2007). El canal se completa con tres subunidades auxiliares: CatSper β (Liu et al., 2007), CatSper γ (Wang et al., 2009) y CatSper δ (Chung et al., 2011), que también se localizan en la pieza principal del flagelo pero con función aún desconocida. Es interesante destacar que en los ratones knockout de CatSper1 no se inmunolocaliza ninguna de las otras seis subunidades, intuyéndose que todas las subunidades son necesarias para el ensamblaje del canal (Carlson et al., 2005; Lishko et al., 2012). Recientemente se ha descubierto que la rápida respuesta a Ca^{2+} que provoca la progesterona sobre los espermatozoides está mediada por CatSper por unión directa sobre la hidrolasa lipídica ABHD2, provocando la retirada de la membrana plasmática del endocannabinoide 2-araquidínoglicerol, que inhibe a los CatSper (Lishko et al., 2011; Strücker et al., 2011; Miller et al., 2016). La actividad de este canal iónico, detectada mediante patch-clamp, es esencial para que el espermatozoide pueda llevar a cabo la hiperactivación (Qi et al., 2007).

2. Ca_vs: Antes del descubrimiento de los CatSper, se pensaba que los principales responsables del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eran los canales dependientes de voltaje Ca_vs que se activan mediante cambios en el potencial de membrana. Según el voltaje al que se activen, se dividen en dos clases: canales que se activan a alto voltaje, que requieren altas despolarizaciones para activarse y se desactivan lentamente, y canales que se activan a bajo voltaje, que se abren con despolarizaciones menores pero se cierran más rápidamente y con potenciales más negativos. Estas últimas se conocen normalmente como corrientes tipo T. El poro de estos canales lo forma una subunidad α codificada por diez genes distintos agrupados en tres familias: Ca_v1, Ca_v2 y Ca_v3. Las dos primeras familias crean poros de alto voltaje y la última

de bajo voltaje o canales de tipo T. También se han descrito cuatro subunidades auxiliares (Catterall, 2000; Catterall et al., 2007; Darszon et al., 2011; Lishko et al., 2012). Muchos de los transcritos de estos genes, tanto de las subunidades α como de las subunidades auxiliares, se han encontrado en células espermatogénicas o en espermatozoides maduros. A nivel de proteína, en espermatozoides se ha localizado un miembro de la familia Cav1 y todos los miembros de las familias Cav2 y Cav3 (Park et al., 2003). Los antagonistas específicos de las familias Cav1 y Cav2 han modificado ciertas respuestas espermáticas al Ca^{2+} (Goodwin et al., 1997; Wennemuth et al., 2000) pero solo las corrientes provocadas por Cav3 han sido medidas mediante estudios de patch-clamp en células espermatogénicas y espermatozoides testiculares, pero no en espermatozoides extraídos del epidídimo (Darszon et al., 2006b; Darszon et al., 2011). Por otro lado, determinados ratones knockouts para algunos de los genes codificantes para Cavs son fértiles, lo cual pone en duda si la función de estos canales en los espermatozoides es esencial (Beuckmann et al., 2003; Lishko et al., 2012).

3. Canales dependientes de nucleótidos cíclicos: Estos canales se activan por la unión al extremo C-terminal de un único nucleótido cíclico (AMPC o GMPc). Son poco selectivos, introduciendo al interior celular tanto Ca^{2+} como Na^+ , son poco dependientes de voltaje y no se desensibilizan. Dos de sus subunidades se han localizado en la pieza principal del flagelo del espermatozoide, aunque los ratones knockout para las mismas siguen siendo fértiles, por lo que la relevancia de este tipo de canales en la fisiología espermática queda en entredicho (Kaupp y Seifert, 2002).
4. También se han localizado en espermatozoides otros canales más o menos selectivos al Ca^{2+} , como los canales TRP (De Blas et al., 2009). Del mismo modo cabe destacar que se han descrito canales de Ca^{2+} relacionados con la liberación al citoplasma de este ion desde reservas intracelulares como el

acrosoma o la RNE (conjunto de vesículas originadas desde la membrana nuclear durante la espermiogénesis) (Franklin, 1968). En este último caso nos referimos a los canales IP_3R y RyR (Walensky y Snyder, 1995; Treviño et al., 1998; Ho y Suárez, 2003; Chiarella et al., 2004).

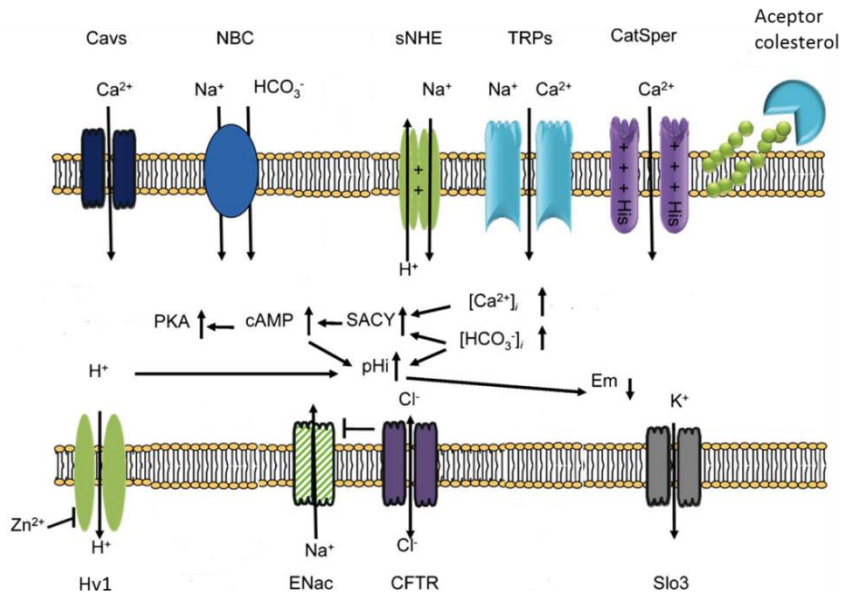


Figura 4: Modelo de permeabilidad iónica y segundos mensajeros durante la capacitación espermática (modificado de Visconti et al., 2011).

2.3.3. AUMENTO DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE TIROSINA

El aumento de la fosforilación en los residuos de tirosina asociado a la capacitación espermática es un proceso que se ha descrito en varias especies, incluida la humana (Visconti et al., 1999c; Tardif et al., 2001; Ficarro et al., 2003; Galantino-Homer et al., 2004; Roy y Atreja, 2008). Aunque no está muy claro el mecanismo que conduce a que se produzca este hecho, se ha demostrado que la ruta de AMPc/PKA es esencial para que se lleve a cabo (Visconti et al., 1995a;

Kalab et al., 1998; Osheroff et al., 1999). Del mismo modo que para otros procesos relacionados con la capacitación, para que se produzca una correcta fosforilación en las tirosinas se requiere la participación de la albúmina o algún otro aceptor de colesterol, HCO_3^- y Ca^{2+} , que conduzcan a la activación de la adenil ciclasa para la síntesis de AMPc. La glucosa, Na^+ y Cl^- también son esenciales para desencadenar este fenómeno (Urner et al., 2001; Hernández-González et al., 2006; Wertheimer et al., 2008). Esta fosforilación solo es detectable a los 45-60 minutos de incubación en condiciones capacitantes, por lo que se relaciona con eventos tardíos de la capacitación que requieren el mantenimiento de los niveles intracelulares de AMPc (Visconti et al., 1995b). En determinadas especies se han detectado proteínas como la MRP4 que se encargan de mantener los niveles intracelulares apropiados de AMPc para que la capacitación siga su curso (Oszycka-Salut et al., 2014). Sin embargo, la PKA es una quinasa de serinas y treoninas y no de tirosinas, por lo que tiene que haber algún otro mecanismo implicado. Se barajan tres hipótesis al respecto: (1) Que la PKA active alguna quinasa de tirosinas, ya sea de forma directa o indirecta; (2) Que la PKA inhiba directa o indirectamente alguna fosfatasa de tirosinas; (3) Que la fosforilación en residuos de serina y treonina por parte de la PKA haga más accesibles a estas proteínas para la fosforilación por parte de quinasas de tirosina (Gadella y Visconti, 2006).

Se ha descrito una variante de splicing de la subunidad α catalítica de la PKA exclusiva de espermatozoides de mamíferos denominada C α 2. Los ratones knockout para esta variante son infértiles sin observarse ninguna otra función afectada. Además, la infertilidad de estos ratones se basa en defectos en la capacitación espermática ya que no se detectaron fosforilaciones en los residuos de tirosinas, el mismo fenotipo desarrollado en los ratones infértiles knockout para la adenil ciclasa o para el gen AKAP, uno de los primeros sustratos de la PKA (Miki et al., 2002; Espósito et al., 2004; Nolan et al., 2004) y observado anteriormente en los experimentos con los agonistas y/o antagonistas de la PKA (Visconti et al., 1995a; Vijayaraghavan et al., 1997a).

Las quinasas de tirosina que presentan mayor cantidad de evidencias relacionadas con la capacitación espermática son las pertenecientes a la familia de quinasas Src (Viscontti et al., 2011; Gangwar y Atreja, 2015). La inhibición farmacológica de esta familia Src conduce a un bloqueo en la fosforilación de

tirosinas asociada a la capacitación espermática (Baker et al., 2006; Lawson et al., 2008; Mitchell et al., 2008; Varano et al., 2008). Sin embargo, los estudios en ratones knockout para la quinasa cSrc demostraron que esta quinasa no es esencial para la fosforilación de tirosinas, quizá porque su función es suplida por alguna otra quinasa. Por otro lado, la inhibición específica de cSrc sí provoca un descenso en la movilidad y en la fosforilación de tirosinas, además de inhibir las fosforilaciones en serinas y treoninas inducidas directamente por la PKA. Estos hechos parecen indicar que la familia de quinasas Src actúa de forma paralela a la PKA y su activación no está mediada a través de la ruta AMPc/PKA. De hecho, la quinasa cSrc fosforila a la fosfatasa de serina y treonina PP2A en su subunidad catalítica, inhibiendo su actividad. Por lo tanto, la inhibición de la cSrc producirá un aumento de la actividad de la fosfatasa PP2A que eliminará rápidamente la acción directa de la PKA. En este sentido, se ha observado que la adición de inhibidores de las fosfatasas de serina y treonina revierte la acción de los inhibidores de cSrc, permitiendo la libre acción de la PKA sobre sus sustratos (Krapf et al., 2010; Battistone et al., 2013; Signorelli et al., 2013).

Poco se sabe de los sustratos fosforilados en sus tirosinas durante la capacitación, aunque sí está bien descrita la fosforilación en AKAP4, AKAP3, CABYR, ODF, la aldolasa específica de espermatozoides y la piruvato hidrogenasa (Carrera et al., 1996; Ficarro et al., 2003; Harrison, 2004; Mitra et al., 2005; Arcelai et al., 2008; Li et al., 2010).

Paralelamente, también se han descrito diversos isoformas de la PKC en espermatozoides (Rotem et al., 1990b; Lax et al., 1997; Rotman et al., 2010). Su activación con ésteres de forboles provoca cambios en la movilidad, en la reacción acrosómica y en los niveles intracelulares de AMPc (Visconti y Tezón, 1989; Rotem et al., 1990b; Naor y Breitbart, 1997).

2.4. QUIMIOTAXIS

La quimiotaxis es la capacidad que tienen los espermatozoides para alcanzar al ovocito siguiendo un gradiente químico (Chang y Suárez, 2010). Este proceso está bien descrito en especies invertebradas marinas con fecundación externa como el erizo de mar y las ascidias, ya que la liberación de quimioatrayentes específicos de especie por parte de los ovocitos favorece el

encuentro entre ambos gametos en la inmensidad del océano (Kaupp et al., 2008). Sin embargo, su papel no está tan claro en mamíferos, ya que se puede confundir con otros fenómenos que conducen a los espermatozoides hasta el ovocito como la termotaxis (gradiente térmico) o la reotaxis (capacidad para nadar contra un flujo). Aun así, en diversas especies, incluida la humana, se ha demostrado que este fenómeno también ocurre, aunque prablemente en escalas espaciales muy cortas y limitadas al oviducto (Pérez-Cerezales et al., 2015). En los animales con fecundación interna, la quimiotaxis espermática solo se produce en la fracción de espermatozoides capacitados (Cohen-Dayag et al., 1995).

Diversos fluidos biológicos han sido testados para demostrar la atracción que ejercen sobre los espermatozoides. Por ejemplo, el fluido folicular generado en el interior del folículo preovulatorio puede depositarse en el interior de la trompa de Falopio y potencialmente ejercer un poder atrayente sobre los espermatozoides. Este hecho se ha confirmado en varias especies como el humano, el ratón o el conejo (Ralt et al., 1991; Oliveira et al., 1999; Fabro et al., 2002). Los experimentos sobre la quimioatracción que produce el fluido folicular pusieron de manifiesto que no existen mecanismos específicos de especie en mamíferos, ya que el fluido folicular humano es capaz de atraer a los espermatozoides de conejo y viceversa (Sun et al., 2003). Del mismo modo, el complejo cúmulo-ovocito también ejerce un efecto atrayente sobre los espermatozoides. Si condicionamos un medio cultivando en él estos complejos o simplemente células de cúmulo aisladas, éste provoca la atracción de los espermatozoides en humanos y conejo. Sin embargo, con medios condicionados por el cultivo de ovocitos sin células de cúmulo solo se ha observado este efecto en humanos y no en conejos (Sun et al., 2005; Guidobaldi et al., 2008; Armon et al., 2014).

Por otro lado, se han descrito varias moléculas que pudieran funcionar como quimioatrayentes, algunas con origen en las cercanías del lugar de fecundación y otras no (Eisenbach y Giojalas, 2006). Entre ellas, destacamos:

1. Péptidos N-formil(metil): no se ha descubierto su origen en el tracto reproductor femenino pero son capaces de atraer a los

- espermatozoides a concentraciones muy bajas (Gnessi et al., 1985).
2. Péptido natriurético atrial: hormona localizada en el oviducto y en el fluido folicular que ejerce quimioatracción en espermatozoides humanos y de ratón (Zamir et al., 1993; Anderson et al., 1995; Bian et al., 2012).
 3. Sustancia P y β -endorfina: se ha descrito que estos pequeños péptidos presentan un poder quimioatrayente sobre los espermatozoides de ratón (Sliwa, 2001).
 4. Nucleótidos cíclicos: se ha demostrado que la presencia de los análogos permeables de AMPc y GMPc induce la quimiotaxis en espermatozoides humanos (Miraglia et al., 2007; Teves et al., 2009).
 5. Sustancias olorosas: aunque no sean de origen animal y se empleen en perfumería, se ha demostrado que las sustancias olorosas tienen un poder quimioatrayente sobre los espermatozoides. El “bourgeonal” es capaz de atraer a los espermatozoides humanos, donde se han encontrado varios receptores de sustancias olorosas acoplados a proteínas G, entre los que destaca hOR17 (Spehr et al., 2003; Spehr et al., 2006; Veitinger et al., 2011). Los mismos descubrimientos se han producido en el ratón, donde también se ha localizado este tipo de receptores con otra sustancia olorosa denominada “lyral” que ejerce el mismo efecto atrayente sobre los espermatozoides (Touhara et al., 1999; Burnett et al., 2011).
 6. Quimioquinas: las células de granulosa y de cúmulo de los folículos periovulatorios son capaces de segregar al fluido folicular quimioquinas como RANTES o CCL5 (Isobe et al., 2002), CCL7 (Tamba et al., 2008), CCL20 (Caballero-Campo et al., 2014), SDF1 o CXCR4 (Zuccarello et al., 2011), que son capaces de quimioatraer a los espermatozoides. En relación a los tres últimos ejemplos, los receptores de los mismos se han localizado en espermatozoides.
 7. Progesterona: esta hormona esteroidea secretada por las células del cúmulo y presente en el fluido folicular es el

quimioatrayente espermático más estudiado. Produce su acción a muy bajas concentraciones y solo sobre una baja proporción de espermatozoides (Villanueva-Díaz et al., 1995; Jeon et al., 2001; Teves et al., 2006; Gatica et al., 2013). Los experimentos en los que se eliminó la progesterona del medio condicionado por células de cúmulo con anticuerpos específicos demostraron que el poder quimioatrayente que tiene este medio se veía disminuido tanto en humanos como en conejos (Guidobaldi et al., 2008; Oren-Benaroya et al., 2008).

El comportamiento de los espermatozoides para acercarse a la fuente de cualquiera de estas sustancias quimioatrayentes u otras aún no descritas se divide en dos fases (Figura 5). En primer lugar, los espermatozoides capacitados se mueven de forma recta en dirección ascendente al gradiente de la sustancia con poder atrayente hasta que dejan de sentir el gradiente. En ese momento se paran y entran en un momento de receso donde se da un episodio transitorio de hiperactivación que acaba en una reorientación del espermatozoide que le permite de nuevo nadar en función del gradiente quimiotáctico (Armon y Eisenbach, 2011). Finalmente se produce una alternancia intermitente entre un patrón simétrico y uno asimétrico de batido flagelar (Chang y Suárez, 2010). Aunque de la hiperactivación hablaremos en el siguiente apartado, el papel del Ca^{2+} vuelve a ser esencial para el desarrollo de este fenómeno. La relación existente entre quimiotaxis e hiperactivación se pone de manifiesto al demostrar que tanto el “bourgeonal” como el “lyral” provocan un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la pieza media del flagelo (Spehr et al., 2003; Fukuda et al., 2004; Sperh et al., 2004; Spehr et al., 2006). En los espermatozoides humanos, la progesterona también conduce a un aumento gradual de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, incluso en oscilaciones en la base del flagelo, que se traducen en aumentos en la curvatura del flagelo durante su batida (Harper et al., 2004).

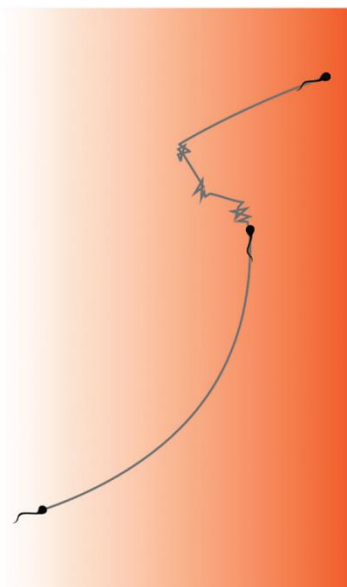


Figura 5: Modelo del comportamiento espermático ante un gradiente quimioatrayente. La intensidad del color de fondo representa la concentración del quimioatrayente (Pérez-Cereales et al., 2015).

2.5. HIPERACTIVACIÓN

La hiperactivación es un tipo especial de movilidad que adquieren los espermatozoides que se caracteriza por un patrón de batido flagelar extremadamente asimétrico y de gran amplitud que provoca un movimiento del mismo similar a un látigo y que conduce al espermatozoide a tener trayectorias circulares, en zigzag o en ocho (Figura 6) (Yanagimachi, 1994; Olson et al., 2011). Este patrón es esencial para que, en determinados momentos durante el viaje por el tracto reproductor femenino, el espermatozoide pueda seguir avanzado por el mismo hasta encontrarse con el ovocito (Suárez y Pacey, 2006). Como hemos dicho anteriormente, los espermatozoides al entrar en contacto con el plasma seminal, donde hay concentraciones más altas de HCO_3^- , adquieren la movilidad activada que conduce a un patrón de batido flagelar de baja amplitud y simétrico, lo que provoca que el espermatozoide se mueva en trayectorias lineales (Turner, 2006). Pero una vez se adentran en el tracto femenino, deben atravesar determinados fluidos que presentan una mayor viscosidad, por lo que presentar una movilidad hiperactivada es completamente esencial para que puedan

alcanzar el lugar de unión con el ovocito (Mullins y Saacke, 1989; Suárez y Osman, 1987; Suárez et al., 1992). Por otro lado, el inicio del oviducto funciona como reservorio de los espermatozoides, ya que muchos de ellos quedan retenidos en las criptas del mismo. Este hecho ocurre gracias a la interacción del epitelio del oviducto con determinadas proteínas de la cabeza espermática y permite que el espermatozoide mantenga su capacidad fecundante hasta que la ovulación se produzca (Pollard et al., 1991; Demott y Suárez, 1992; Suárez y Pacey, 2006). Es en ese momento cuando se pierden parte de esas proteínas que adhieren a los espermatozoides a estos reservorios y cuando aparece la movilidad hiperactivada que ayuda a liberarlos de estas criptas (Demott y Suárez, 1992; Gwathmey et al., 2003; Ignatz et al., 2007; Suárez, 2008a). Una vez en el interior del oviducto, los espermatozoides hacen uso de la movilidad hiperactivada para avanzar a través del fluido extremadamente viscoso que encuentran allí. Por último, cuando avanzan hacia el ovocito, también necesitan este tipo de movilidad para atravesar la matriz extracelular de las células del cúmulo y la zona pelúcida una vez desencadenada la reacción acrosómica (Suárez, 2008b; Olson et al., 2011).

Como en otros comportamientos del espermatozoide, el Ca^{2+} tiene un papel central en la regulación de la hiperactivación. Los espermatozoides tratados con ionóforos de Ca^{2+} como el A23187 o la ionomicina se hiperactivan (Suárez et al., 1987; Márquez y Suárez, 2007). Del mismo modo, mediante sondas fluorescentes intracelulares de unión específica al Ca^{2+} , se ha visto que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es mayor en los espermatozoides hiperactivos que en los simplemente activos (Suárez et al., 1993). En los experimentos con espermatozoides demembrados con el detergente Triton X-100, donde los espermatozoides quedan inmóviles, el movimiento comienza a recuperarse cuando son expuestos a una concentración de Ca^{2+} de aproximadamente 50 nM. Los primeros espermatozoides hiperactivos comienzan a aparecer a concentraciones cercanas a 100 nM y la mayoría de ellos presentan hiperactivación cuando la concentración se sitúa alrededor de los 400 nM. Estos experimentos ponen de manifiesto que el Ca^{2+} actúa directamente sobre el axonema del flagelo ya que el tratamiento con detergente deja a los espermatozoides sin funcionalidad en las membranas plasmática, mitocondrial y acrosomal (Ho et al., 2002). La acción del Ca^{2+} está mediada por la CaM y la CaMKII (Ignatz y Suárez, 2005). Si a los

espermatozoides demembrados se les extraía también la CaM, el aumento de la concentración de Ca^{2+} no provocaba el inicio de la movilidad ni la hiperactivación hasta que no se añadía CaM al medio. Tras la adición de inhibidores de CaMKII junto con CaM en presencia de Ca^{2+} no se producía el mismo aumento en el número de espermatozoides hiperactivados que cuando no se añadían. La unión Ca^{2+} -CaM podría activar a CaMKII para fosforilar alguna proteína del axonema que condicionara la asimetría del batido flagelar (Suárez, 2008b; Olson et al., 2011). Del mismo modo, ambas proteínas se han inmunolocalizado en la pieza principal del flagelo (Schlingmann et al., 2007).

Hay dos fuentes principales de Ca^{2+} que pueden conducir a la hiperactivación: el Ca^{2+} extracelular y el Ca^{2+} intracelular. Ya hemos hablado de las vías de entrada del Ca^{2+} extracelular al espermatozoide y destacado la función de los CatSper, únicos canales cuyos ratones knockout derivan en infertilidad. El origen de la infertilidad en estos ratones se debe a la incapacidad de sus espermatozoides para hiperactivarse. Estos mismos espermatozoides sí son capaces de fecundar *in vitro* ovocitos desprotegidos de la zona pelúcida, donde la hiperactivación no es necesaria (Ren et al., 2001; Quill et al., 2003; Jin et al., 2007; Qi et al., 2007). Del mismo modo, los espermatozoides de estos ratones no pueden ascender por el tracto reproductor femenino hasta alcanzar las inmediaciones del ovocito (Ho et al., 2009). Además, su movilidad activada no es normal y se asemeja a la que adoptan los espermatozoides tratados con quelantes de Ca^{2+} , lo que demuestra que estos canales son esenciales tanto para la movilidad activada como para la hiperactivada (Márquez et al., 2007). No se ha observado que ninguno de los mutantes knockout para el resto de canales de Ca^{2+} presentes en los espermatozoides sean infértiles, aunque se han detectado patrones de movilidad espermática alterados, como es el caso del knockout para $\text{Ca}_v2.3$ (Sakata et al., 2002). Esto no quiere decir que otros canales de Ca^{2+} no puedan influir en la hiperactivación espermática, pero su función no es esencial para desencadenar este fenómeno (Suárez, 2008b).

Las fuentes de Ca^{2+} intracelular son, como comentamos anteriormente, la RNE y el acrosoma. La influencia de estos depósitos de Ca^{2+} ha sido ampliamente estudiada en la descripción de la hiperactivación. En ausencia de Ca^{2+} extracelular, determinados fármacos capaces de liberar el Ca^{2+} intracelular de

sus reservorios, como la tapsigargina o el timerosal, son capaces de provocar hiperactivación espermática (Ho y Suárez, 2001b; Ho y Suárez, 2003). La inmunolocalización de los canales IP_3R y RyR en ambos componentes afianza el concepto de la importancia de estos reservorios en la hiperactivación (Olson et al., 2011). La entrada del Ca^{2+} extracelular y la liberación del Ca^{2+} intracelular se pueden complementar y ambas pueden regular la hiperactivación de modo conjunto, ya que se ha observado en espermatozoides de ratón, donde la forma de la cabeza no es simétrica, que la asimetría del batido flagelar es en un sentido u otro dependiendo del origen del Ca^{2+} . Esta estrategia permitiría en determinadas ocasiones liberar a los espermatozoides de los reservorios del epitelio del tracto reproductor femenino y en otras les permitiría reorientarse en función de un gradiente quimiotáctico (Olson et al., 2011).

Como la hiperactivación no es continua, sino que es un procedimiento reversible e inducible en varias ocasiones durante el transcurso del trayecto del espermatozoide hasta el ovocito, el descenso de la $[Ca^{2+}]_i$ es necesario para poder regular este mecanismo. Del mismo modo que antes, el Ca^{2+} puede ser devuelto al medio extracelular o nuevamente secuestrado en algún depósito intracelular. La primera vía se realiza principalmente a través de la ATPasa de Ca^{2+} PMCA4, que exporta un ion Ca^{2+} mientras que introduce uno o dos iones H^+ con el gasto de una molécula de ATP y se localiza principalmente en la pieza principal del flagelo (Wennemuth et al., 2003b; Okunade et al., 2004). El intercambiador Na^+/Ca^{2+} actúa tanto para extruir Ca^{2+} al exterior del espermatozoide como para interiorizarlo en algún depósito intracelular. Por cada ion Ca^{2+} que sale del citosol, introduce tres iones Na^+ . Este intercambiador se ha visualizado en la región postacrosomal y en el flagelo (Jiménez-González et al., 2006; Krasznai et al., 2006). En este sentido, y debido a su proximidad con el RNE, también se ha propuesto que las mitocondrias de la pieza media pudieran eliminar Ca^{2+} del citosol a través de un transportador uniporte mitocondrial que se activa a $[Ca^{2+}]_i$ cercanas a 500 nM, similares a las descritas para la hiperactivación (Bravo et al., 2015).

La forma de medir la hiperactivación en los espermatozoides se basa en los sistemas computerizados CASA. La determinación del porcentaje de espermatozoides que están hiperactivados en un determinado momento se

realiza mediante medidas indirectas que describen el patrón de batido flagelar fijando umbrales mínimos para la velocidad curvilínea y la amplitud del movimiento lateral de la cabeza y máximos para la linealidad. Estos valores deben ser definidos para cada sistema en relación al número de imágenes por segundo y a la velocidad de captación de imágenes que tenga el equipo de medida (Suárez, 2008b).

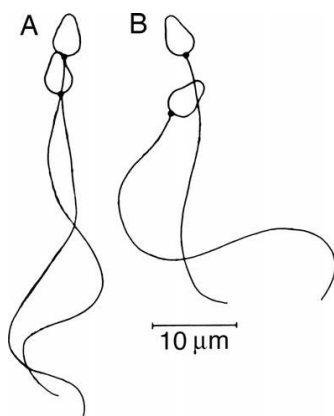


Figura 6: Patrones de batido flagelar. (A) Movilidad activada. (B) Movilidad hiperactivada (Suárez, 2008b).

2.6. REACCIÓN ACROSÓMICA Y FUSIÓN CON EL OVOCITO

El acrosoma es un orgánulo exocitótico derivado del aparato de Golgi y localizado en la parte más apical de la cabeza espermática, rodeando al núcleo. Su función principal es ayudar al espermatozoide a atravesar las capas que rodean al ovocito, como las células del cúmulo y la zona pelúcida (Buffone et al., 2008; Buffone et al., 2014). El lumen del acrosoma contiene componentes solubles y una estructura particular llamada matriz acrosomal (Olson y Winfrey, 1994). Este lumen está rodeado por una única membrana dividida en dos partes, la MAE y la MAI. La MAE se relaciona con la membrana plasmática que rodea al acrosoma y la MAI con la membrana nuclear (Buffone et al., 2014).

Tradicionalmente se ha definido la capacitación espermática como el proceso de múltiples cambios que prepara al espermatozoide para poder realizar la reacción acrosómica. Los agonistas clásicos que desencadenan la reacción

acrosómica, como la zona pelúcida y la progesterona, solo son capaces de inducir este fenómeno cuando los espermatozoides han sido capacitados en presencia de albúmina y HCO_3^- (Buffone et al., 2012). La alcalinización intracelular que acompaña a la capacitación y está principalmente mediada por el canal Hv1 (Lishko et al., 2010) y por el intercambiador Na^+/H^+ (Wang et al., 2007) regula indirectamente la reacción acrosómica a través del canal de K^+ SLO3, que se activa a pH intracelular básico (Martínez-López et al. 2009; Santi et al., 2010). En este sentido, la hiperpolarización de la membrana plasmática está íntimamente relacionada con la reacción acrosómica, fundamentalmente a través del canal SLO3, que incrementa la permeabilidad del K^+ en el espermatozoide hasta tres veces (Chávez et al., 2013). Los espermatozoides de los ratones knockout para el canal SLO3 son incapaces de hiperpolarizar su membrana y de sufrir la reacción acrosómica (Santi et al., 2010). Por este motivo, el K^+ , además de la albúmina y el HCO_3^- , es esencial para que los espermatozoides capacitados puedan realizar la reacción acrosómica (Florman et al., 1992). Del mismo modo, los espermatozoides no capacitados expuestos a valinomicina, que es un agente hiperpolarizante, o a amilorida, que produce la hiperpolarización de la membrana a través de los canales ENaCs, sufren la reacción acrosómica una vez son expuestos a zona pelúcida o progesterona (De la Vega-Beltrán et al., 2012; Stival et al., 2015). Como comentamos anteriormente en relación al potencial de membrana, se han descrito dos subpoblaciones en una muestra de espermatozoides capacitados en cuanto al potencial de membrana: una de ellas tiene un potencial de membrana de aproximadamente -35 mV, similar a los espermatozoides no capacitados, y otra lo tiene alrededor de -80 mV (Arnoult et al., 1999; Escoffier et al., 2015). Esta característica puede estar relacionada con el hecho de que solo una parte de la población de espermatozoides capacitados sea capaz de sufrir la reacción acrosómica (Salicioni et al., 2007). En este sentido, también se ha demostrado que no toda la población espermática reacciona simultáneamente a los estímulos que conducen a la liberación acrosomal, probablemente porque se encuentren en diferentes estadios de la capacitación (Harper et al., 2008). El AMPc, mensajero esencial en la capacitación espermática, también puede regular este proceso a través del intercambiador Na^+/H^+ , ya que posee un sitio de unión regulador para dicho segundo mensajero. La apertura de este intercambiador provoca la alcalinización del citoplasma espermático conduciendo a la activación del canal SLO3 (Lishko et

al., 2012). Cuando la PKA es bloqueada farmacológica o genéticamente, la reacción acrosómica no se produce, probablemente por la inhibición de la activación de la quinasa Src, ya que el bloqueo farmacológico de esta quinasa inhibe la hiperpolarización y la reacción acrosómica provocada por la progesterona (Visconti et al., 1995a; Stival et al., 2015).

Como en todo proceso de exocitosis, el Ca^{2+} juega un papel esencial en la reacción acrosómica (Dan, 1954; Yanagimachi, 1994). Los inductores fisiológicos de este proceso mejor estudiados son la proteína ZP3, perteneciente a la zona pelúcida, y la progesterona. Ambos provocan incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el espermatozoide. Mientras que la ZP3 produce un aumento súbito de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con un mantenimiento del nivel intracelular del ion (Brewis et al., 1996; O'Toole et al., 2000), la progesterona provoca un movimiento bifásico del Ca^{2+} a través de la membrana plasmática del espermatozoide compuesta por una entrada rápida y transitoria seguida por otra más lenta y sostenida (Figura 7) (Blackmore et al., 1990; Baldi et al., 1991). Una vez demostrado que la hiperpolarización es esencial para que se lleve a cabo la reacción acrosómica, los principales candidatos para provocar la entrada de Ca^{2+} indispensable para que produzca el proceso excitotónico fueron los Cav. De este modo, la despolarización de la membrana también sería un mecanismo de control que evitara la reacción acrosómica prematura (Arnoult et al., 1996; Florman et al., 1998). Determinados estudios con antagonistas de estos canales han puesto de manifiesto su importancia en la entrada de Ca^{2+} necesaria para la reacción acrosómica (Darszon et al., 2011). Sin embargo, no se han podido medir las corrientes de Ca^{2+} por patch-clamp y los ratones knockouts para los canales $\text{Cav}3.1$ y $\text{Cav}3.2$ son fértiles (Wennemuth et al., 2000; Sakata et al., 2001; Sakata et al., 2002). Aunque el papel de estos canales en la reacción acrosómica esté en entredicho, recientemente se ha documentado que el enriquecimiento local del lípido GM_1 presente en las balsas lipídicas regula la actividad del canal $\text{Cav}2.3$ en la reacción acrosómica (Cohen et al., 2014). Por otro lado, la progesterona es capaz de inducir la entrada de Ca^{2+} en el espermatozoide a través de los CatSper a concentraciones de 1 nM, y es capaz de provocar la reacción acrosómica a concentraciones mayores, en torno a 1 μM (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011). La inhibición en ratones de la enzima ABHD2, mediadora entre la progesterona y los CatSper, anula parcialmente la reacción acrosómica (Miller et

al., 2016). Sin embargo, la reacción acrosómica mediada por la proteína ZP3 se produce en espermatozoides de ratón knockout para alguno de las subunidades de los CatSper (Xia y Ren, 2009). Por tanto, otros canales de Ca^{2+} descritos en el espermatozoide pueden tener también un papel relativo en la regulación de la reacción acrosómica (Darszon et al., 2011).

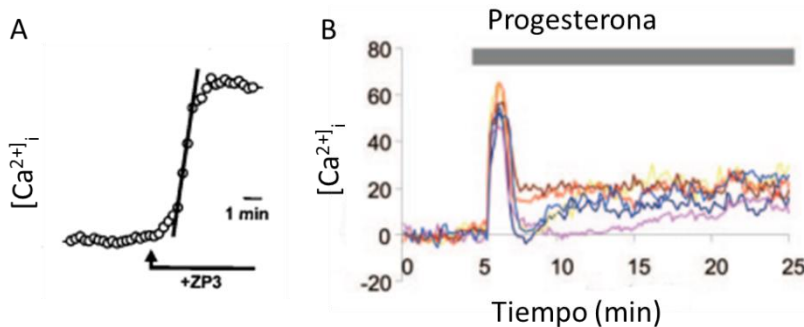


Figura 7: Respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de los espermatozoides a agonistas fisiológicos de la reacción acrosómica. (A) Respuesta a ZP3 (modificado de O'Toole et al., 2000). (B) Respuesta a progesterona (modificado de Harper et al., 2004).

La secreción del acrosoma es un proceso irreversible, único y unidireccional que se basa en la fusión múltiple de la MAE y la membrana plasmática que la rodea, generando vesículas híbridas de membrana plasmática y MAE que se liberan junto a citosol y el contenido acrosomal (Figura 8). Contrariamente a lo que ocurre en los procesos de exocitosis de las células somáticas, no existe reciclaje de la membrana tras la exocitosis ni existe endocitosis, por lo que una escasa proporción de la MAE se incorpora a la membrana plasmática con la que se fusiona, quedando entonces la MAI como la capa más externa de la cabeza del espermatozoide y responsable del reconocimiento y unión al ovocito (Okabe, 2013; Tomes, 2015). La MAE y la membrana plasmática sufren un cambio morfológico tras aplicarse algún estímulo que conduzca a la reacción acrosómica, como la adición del ionóforo de Ca^{2+} A23187 o la progesterona. Antes de dicho estímulo, ambas membranas están separadas unos 18 nm. Tras la aplicación del mismo, sufren invaginaciones y picos donde se unen, produciéndose los puntos de fusión de ambas que originan las vesículas híbridas, que se liberan junto con el contenido acrosomal

(Zanetti y Mayorga, 2009; Sosa et al., 2015; Lucchesi et al., 2016; Sosa et al., 2016). Se han encontrado diversas proteínas encargadas de controlar la exocitosis celular en los espermatozoides. En los espermatozoides no estimulados, la maquinaria molecular encargada de la fusión, la superfamilia SNARE, se encuentra inactiva, en lo que se conoce como configuración *cis* de este sistema (De Blas et al., 2005). La superfamilia Rab, encargada de reconocer vesículas exocitóticas y membrana plasmática, también se localiza en espermatozoides, donde se ha puesto de manifiesto la presencia de Rab 3 y Rab 27. Estas proteínas se encuentran unidas a GDP e inactivas en los espermatozoides que no se encuentran bajo ningún estímulo que provoque la reacción acrosómica (Bustos et al., 2012). Las sinaptotagminas, encargadas de la unión al Ca^{2+} que provoca la exocitosis, también se encuentran inactivas en los espermatozoides no estimulados (Roggero et al., 2005), al igual que la proteína de fusión NSF (Zarelli et al., 2009). Una vez se somete a los espermatozoides a un inductor de la reacción acrosómica, se producen las invaginaciones en la MAE y la membrana plasmática. Este hecho es dependiente de AMPc (Lucchesi et al., 2016; Sosa et al., 2016). Posteriormente, Rab 3 y Rab 27 pasan a su forma activa cambiando GDP por GTP, probablemente a través de la acción de la proteína ARF6 (Branham et al., 2009; Pelletan et al., 2015), se desfosforila la NSF, la cual se une al complejo *cis* SNARE para desensamblarlo y transformarlo a su configuración *trans*, que estabiliza las uniones entre la MAE y la membrana plasmática (Ramalho-Santos y Schatten; 2004; Zarelli et al., 2009) y se desfosforila la sinaptotagmina (Castillo Bennett et al., 2010). La unión entre ambas membranas que acaba conduciendo a la liberación acrosomal también está mediada por los complejos ESCRT (Pocognoni et al., 2015). Una vez en contacto ambas membranas, se libera Ca^{2+} del interior del acrosoma a través de los canales sensibles a IP_3 provocando un aumento localizado de este ion que permite la actividad completa del complejo *trans* SNARE (Roggero et al., 2007).

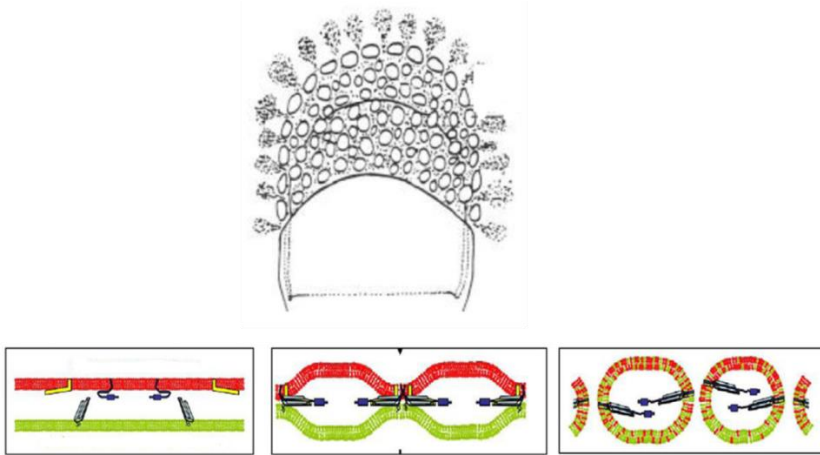


Figura 8: Representación de la reacción acrosómica. En rojo se representa la membrana plasmática y en verde la MAE (modificado de Gadella y Luna, 2014).

Por otro lado, los lípidos también regulan la exocitosis del acrosoma, en primer lugar, evitando que se produzca de forma prematura gracias a la riqueza de la membrana en esteroides que dificultan su fluidez, y posteriormente desencadenándola por la pérdida de los mismos asociada a la capacitación (Strott e Higashi, 2003). Los lípidos pueden reorganizar la localización de las maquinarias encargadas de la fusión plasmática, regular la función de determinados canales iónicos como Cav2.3 (Cohen et al., 2014) o la señalización a través de algunas rutas de señalización. Las balsas lipídicas pueden actuar en este sentido. En las fracciones resistentes a detergentes se han localizado numerosas proteínas relacionadas con la reacción acrosómica como algunos canales de calcio y algunas proteínas de fusión de la familia SNARE o la NSF (Asano et al., 2010). Sin embargo, las proteínas de la familia Rab no se asocian a estas fracciones (Pyenta et al., 2001).

Tradicionalmente se ha considerado que la reacción acrosómica tiene lugar cuando el espermatozoide entra en contacto con la zona pelúcida del ovocito, ya que el acrosoma contiene enzimas capaces de degradar esta capa, como hialuronidasas y acrosina (Yamane, 1930; Leonard y Kurzrok, 1946; Zaneveld et al., 1969). El receptor ZP3R, también llamado sp56, es el encargado de reconocer la proteína ZP3 de la zona pelúcida y desencadenar la reacción

acrosómica. Sin embargo, esta proteína se localiza en la MAE, por lo que debe ser traslocada a la membrana plasmática durante la capacitación del espermatozoide por algún mecanismo no conocido hasta la fecha para que pueda reconocer a su sustrato y logre desencadenar el proceso (Cheng et al., 1994; Kim et al., 2001). Algo similar ocurre con la zonadhesina (Gao y Garbers, 1998; Tardif et al., 2010; Kongmanas et al., 2015). La liberación del contenido acrosomal se produce durante aproximadamente las dos horas posteriores al reconocimiento de ZP3 por parte de ZP3R (Buffone et al., 2009). La acrosina, proteasa de serinas, facilita y acelera este proceso. La proacrosina se activa en acrosina a pH neutro, hidrolizando entonces péptidos de forma similar a la tripsina. El pH alcalino del acrosoma mantiene esta enzima inactiva y no es funcional hasta que la reacción acrosómica se produce. El bloqueo farmacológico o mediante anticuerpos demuestran que es una enzima clave en la degradación de la zona pelúcida, aunque los ratones knockout para este gen son fértiles ya que solo presentan un retardo temporal en la penetración de la zona pelúcida (Baba et al., 1994; Adham et al., 1997; Yamagata et al., 1998). Sin embargo, el proteasoma 26S se encuentra tanto en la membrana plasmática como en la MAE y la MAI del acrosoma y el bloqueo del sistema ubiquitina-proteasoma sí produce efectos netamente negativos sobre la fecundación (Yi et al., 2007; Yi et al., 2010). Para atravesar completamente la zona pelúcida, los espermatozoides también se unen a las proteínas que forman la matriz de la misma, como la ZP2, que sirve como ligando para la unión secundaria de los espermatozoides acrosomo-reaccionados a la zona pelúcida. Recientemente se ha demostrado que esta proteína es necesaria para la completa penetración de la zona pelúcida por espermatozoides humanos incluso en ausencia de ZP3 (Avella et al., 2014). La movilidad hiperactivada en el espermatozoide también es esencial para poder completar con éxito este proceso (Bedford, 1998). Sin embargo, la creación de una línea transgénica de ratón donde se unió el gen de la proteína verde fluorescente al promotor de la acrosina y el gen de la proteína roja fluorescente a un promotor exclusivo de la mitocondria permitió visualizar los espermatozoides con el acrosoma intacto y acrosomo-reaccionados *in vivo* (Hasuwa et al., 2010; Hirohashi et al., 2011), demostrándose que la mayoría de espermatozoides sufren la reacción acrosómica antes de unirse a la zona pelúcida. De hecho, el 90% de espermatozoides que consiguen la fecundación han realizado la reacción acrosómica antes de unirse a la zona pelúcida (Jin et al., 2011). Esto sugiere que

la reacción acrosómica debe producirse a lo largo del tracto reproductor femenino o en las células del cúmulo que rodean al ovocito tras la ovulación. Los espermatozoides son capaces de degradar el ácido hialurónico, principal componente de la matriz extracelular de las células del cúmulo, mediante hialuronidasas que se expresan en la membrana plasmática de la cabeza espermática, como SPAM1 y Hyal5. Sin embargo, los ratones knockout para estas enzimas no presentan infertilidad (Kimura et al., 2009). Las células del cúmulo sintetizan y excretan progesterona, un fuerte inductor de la reacción acrosómica, que puede provocar la misma mientras los espermatozoides deshacen las uniones entre ellas para alcanzar la zona pelúcida (Roldán et al., 1994). En todo el tracto reproductor femenino también se han encontrado espermatozoides acrosomo-reaccionados incluso antes de estar en contacto con las células del cúmulo (Chang y Suárez, 2012; Hirohashi et al., 2015). Esto hace pensar que la vida del espermatozoide que ya ha realizado la reacción acrosómica es más larga de lo que se pensaba. En este sentido, se han recuperado los espermatozoides que ya habían entrado en el espacio perivitelino de un ovocito y se han puesto en contacto con nuevos ovocitos rodeados de células del cúmulo, observándose la correcta fecundación de estos últimos por parte de los espermatozoides acrosomo-reaccionados recuperados (Inoue et al., 2011).

La reacción acrosómica prepara a los espermatozoides para la fecundación (Austin y Bishop, 1958). Los intentos de que la unión espermatozoide-ovocito se produzca con espermatozoides que no han realizado la reacción acrosómica han sido infructuosos (Yanagimachi, 1994). Tras la reacción acrosómica, la parte más externa de éste es la MAI, aunque la fusión con el oolema no se produce directamente con la MAI, sino con el segmento ecuatorial de la cabeza (Bedford et al., 1979). Aunque esta región no sufre el proceso de vesiculización que si experimentan la membrana plasmática y la MAE, no presenta capacidad para fusionarse con el ovocito hasta que la reacción acrosómica no se ha producido (Bedford, 2004). Uno de los hechos que pueden provocar este fenómeno es que el propio contenido acrosomal, una vez liberado, actúe también sobre el segmento ecuatorial, activándolo o eliminando inhibidores que evitaban que esta región presentara fusogenicidad con otras membranas. En este sentido, la acrosina parece actuar sobre la región ecuatorial (Takano et al., 1993). La proteína SPESP1, componente de los acrosomas, también se

encuentra en el segmento ecuatorial de los espermatozoides acrosomo-reaccionados y la adición de anticuerpos específicos contra ella inhibe el reconocimiento espermatozoide-ovocito, al igual que los ratones knockout para esta proteína (Wolcowicz et al., 2003; Wolcowicz et al., 2008; Fujihara et al., 2010; Lv et al., 2010). Las calpaínas, proteasas de cisteínas, se localizan entre la membrana plasmática y la MAE y su inhibición provoca un descenso en las uniones espermatozoide-ovocito (Rojas y Moretti-Rojas, 2000; Yudin et al., 2000). La proteína CD46 se expresa en la superficie espermática solo tras la reacción acrosómica, por lo que habitualmente se ha usado como marcador del proceso (Anderson et al., 1989; Fenichel et al., 1989; Simpson y Holmes, 1994; Inoue et al., 2003). La incubación de espermatozoides acrosomo-reaccionados con anticuerpos específicos para esta proteína inhibe la penetración en ovocitos de hámster desprovistos de la zona pelúcida por parte de espermatozoides humanos (Okabe et al., 1990; Anderson et al., 1993). Sin embargo, los ratones knockout para CD46 son fértiles y solo muestran una aceleración en su reacción acrosómica (Inoue et al., 2003). Otro hecho demostrado es que tras la reacción acrosómica, determinadas proteínas se relocalizan en el espermatozoide y se sitúan en el segmento ecuatorial (Flesch y Gadella, 2000). Este es el caso de la proteína más importante descrita para la unión espermatozoide-ovocito, IZUMO1, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. El análisis *in vivo* de la proteína en ratones transgénicos ha demostrado que se mueve desde la MAE y la MAI hacia la membrana plasmática de la cabeza espermática hasta que se termina asociando con el segmento ecuatorial (Satouh et al., 2012). Esta translocación no se ve en los espermatozoides knockout para TSSK6, una quinasa de serina/treonina que se libera desde el acrosoma y que parece que tiene un papel importante en la relocalización de IZUMO1 (Sosnik et al., 2009). Los ratones knockout para IZUMO1 son infértiles ya que sus espermatozoides no pueden fusionarse con los ovocitos. Este mismo hecho ocurre cuando los espermatozoides acrosomo-reaccionados se incuban con anticuerpos específicos para IZUMO1 (Inoue et al., 2005). Recientemente se ha descrito un receptor folato 4 en ovocitos que presenta afinidad por IZUMO1 y que ha sido bautizado como Juno. Las ratonas knockout para Juno son infértiles porque sus ovocitos son incapaces de fusionarse con los espermatozoides (Bianchi et al., 2014). Otros experimentos donde se han creado líneas celulares que sobreexpresan IZUMO1 han demostrado que para que pueda existir la fusión de estas células

con los ovocitos que expresan Juno es necesaria también la función de CD9 (Chalbi et al., 2014). Otras proteínas, como la fertilina (Cho et al., 1998), la SLLP1 (Mandal et al., 2003) o la ecuatorina (Hao et al., 2014) experimentan una relocalización similar. Sin embargo, la inhibición de su acción o los ratones knockout creados se relacionan con una subfertilidad y no con una infertilidad tan clara como ocurre con el caso de IZUMO1.

Tras la entrada en el ovocito, el espermatozoide tiene que ser capaz de activarlo. Uno de los primeros hechos que se producen en el gameto femenino es la producción de unas oscilaciones de Ca^{2+} que provocan la exocitosis de los gránulos corticales, lo que impide la entrada de otro espermatozoide en el ovocito. Se ha propuesto que estas oscilaciones son provocadas por una PLC específica de espermatozoide llamada PLC ζ (Saunders et al., 2002). La PLC ζ se localiza en la región post-acrosomal del espermatozoide tras la capacitación y la reacción acrosómica (Young et al., 2009). Se ha propuesto que tras la fusión del segmento ecuatorial con la membrana del ovocito, la PLC ζ es liberada al citoplasma ovocitario, siendo capaz allí de hidrolizar PIP₂ en IP₃ y DAG. El IP₃ se uniría a sus receptores específicos de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} ovocitarios provocando la salida de este ion al citoplasma (Anifandis et al., 2016). Diversos estudios apoyan el papel esencial de PLC ζ en la activación ovocitaria. En primer lugar, si se microinyecta en un ovocito un extracto espermático del que se ha eliminado PLC ζ , no se producen las oscilaciones de Ca^{2+} (Yoon y Fissore, 2007). Por otro lado, si microinyectamos la proteína recombinante de PLC ζ , se produce la activación ovocitaria (Yoon et al., 2012). Adicionalmente, la microinyección de un ARN de interferencia para PLC ζ produce un comportamiento anómalo en la liberación del Ca^{2+} intracelular del ovocito (Knott et al., 2005). En humanos se han relacionado determinados casos de fallos de fecundación en tratamientos de reproducción asistida con deficiencias en la PLC ζ espermática, observándose incluso anomalías en el desarrollo embrionario temprano en los casos en los que se ha conseguido la activación de la fecundación (Yoon et al., 2008; Ito et al., 2011; Chithiwala et al., 2015).

2.7. ESTRÉS OXIDATIVO, FRAGMENTACIÓN DEL ADN Y APOPTOSIS

Los altos niveles de estrés oxidativo son capaces de influir en la capacidad fecundante del espermatozoide, ya sea porque afecta a su funcionalidad, porque produce daños en el ADN del espermatozoide o porque afecta al perfil epigenético del mismo (Aitken et al., 2014). No obstante, ciertos niveles de radicales libres son necesarios para que se pueda producir la capacitación de forma completa, sobre todo a nivel de la fosforilación en los residuos de tirosina a través de la inhibición de la fosfatasa de tirosina y de la generación de AMPc (Aitken y Nixon, 2013). Los principales radicales que se generan en los espermatozoides y que influyen en la capacitación son el peróxido de hidrógeno (Bize et al., 1991; Aitken et al., 1995; Rivlin et al., 2004), el anión superóxido (De Lamirande y Gagnon, 1993), y el óxido nítrico (Herrero et al., 2001). La principal fuente de radicales libres en los espermatozoides es la mitocondria, sobre todo al nivel de la membrana mitocondrial interna, donde la producción de peróxido de hidrógeno genera daños en la pieza media provocando una pérdida de movilidad, que puede ser corregida con α -tocoferol (Koppers et al., 2008). Otras fuentes que generan radicales libres en los espermatozoides son las oxidasas de NADPH como NOX5 y las oxidasas de L-aminoácidos como la IL4I1 (Bánfi et al., 2001; Aitken et al., 2015a; Houston et al., 2015).

El principal efecto de los radicales libres es la peroxidación lipídica (Aitken y Clarkson, 1987; Álvarez et al., 1987; Aitken et al., 2016). El alto índice de ácidos grasos poliinsaturados que poseen los espermatozoides, especialmente susceptibles al ataque de los radicales libres, acaban generando peróxidos lipídicos y aldehídos, como el 4-hidroxinonenal, que ejercen una acción inhibitoria sobre la movilidad espermática (Jones et al., 1979; Aitken et al., 2010; Moazamian et al., 2015). Los radicales de peróxidos lipídicos desestabilizan la membrana plasmática porque tienden a absorber átomos de hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, los cuales se unen a átomos de oxígeno, generándose un nuevo radical de peróxido lipídico que provoca una reacción en cadena que propaga la peroxidación lipídica por toda la membrana. La fosfolipasa A2 se adentra en la membrana plasmática para extraer de la misma los peróxidos lipídicos para que sean procesados por la glutatión

peroxidasa (Van Kuijk et al., 1985). Se generan por tanto lisofosfolípidos en la membrana que también la desestabilizan, pudiendo provocar cambios en la funcionalidad de las proteínas integrales de membrana, muchas de ellas relacionadas con el paso iónico a través de la misma e involucradas en la movilidad espermática (Nishikawa et al., 1989; Lundbaek y Andersen, 1994). Por otro lado, el 4-hidroxinonenal es capaz de unirse a las mitocondrias y generar a su vez más especies reactivas de oxígeno, lo cual fuerza al espermatozoide a entrar en rutas apoptóticas (Aitken et al., 2012; Aitken et al., 2015b).

Los espermatozoides evitan entrar en rutas apoptóticas intrínsecas gracias a la acción de la PI3K. Si se inhibe esta enzima, se desencadena una cascada apoptótica que se caracteriza por una rápida pérdida de la movilidad, la generación de especies reactivas de oxígeno, la externalización de fosfatidilserina que es capaz de unirse a anexina V, la vacuolización del citoplasma y el daño oxidativo en el ADN del espermatozoide. La acción de PI3K se lleva a cabo a través de la fosforilación de otra quinasa, la AKT, la cual fosforila a una proteína con efectos anti-apoptóticos llamada BAD. La desfosforilación de BAD genera un proceso apoptótico similar al descrito en células somáticas, salvo en la vía por la que la apoptosis espermática produce daño en el ADN. En las células somáticas, la mitocondria en apoptosis libera endonucleasas o activa las ADNasas citoplasmáticas a través de las caspasas. Estas enzimas llegan al núcleo y provocan el daño en el ADN. En los espermatozoides, la alta compartimentalización hace que estas enzimas no puedan moverse desde la pieza media hasta el núcleo situado en la cabeza, por lo que el único daño en el ADN espermático que puede generar la vía apoptótica se debe a la acción del peróxido de hidrógeno. Es por eso que la mayor parte del daño que se genera en el ADN es de origen oxidativo (Koppers et al., 2011).

La oxidación del ADN espermático se produce principalmente en las zonas donde la presencia de protaminas es menor. El efecto del peróxido de hidrógeno genera principalmente la oxidación de la guanosina a 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG). La ruta de reparación del daño de las bases celulares se compone de dos enzimas. Los espermatozoides poseen la primera de ellas, la OGG1, que corta la 8OHdG de la cadena de ADN, pero no poseen la APE1, encargada de unir una nueva base nitrogenada al sitio que deja la 8OHdG. Por lo tanto, se acaban

generando sitios sin base en los lugares donde el estrés oxidativo produjo una 8OHdG, produciéndose una fragmentación de la doble cadena de ADN, un hecho relacionado con la infertilidad masculina (Shen y Ong, 2000; De Iuliis et al., 2009; Aitken et al., 2010; Noblanc et al., 2013; Ohno et al., 2014).

3. SISTEMA TAQUICINÉRGICO

Las TKs son un conjunto de pequeños péptidos íntimamente relacionados que forman una de las familias peptídicas más conservadas dentro del Reino Metazoa (Severini et al., 2002). Ya en el año 1931 se describió que en extractos alcohólicos de intestino y de cerebro de caballo había una sustancia estable en solución ácida que tenía efectos hipotensos sobre la presión sanguínea y efectos contráctiles sobre el intestino de conejos. Mediante estudios farmacológicos, se puso de manifiesto que dichas acciones no eran dependientes de acetilcolina ni de histamina (Von Euler y Gaddum, 1931). Se trataba de la primera TK descrita, la sustancia P, llamada así desde sus orígenes debido a las notas de protocolo del laboratorio de sus descubridores. No fue hasta 40 años después cuando pudo ser aislada en hipotálamo de vaca para establecer la secuencia y estructura de este undecapéptido (Chang y Leeman, 1970; Chang et al., 1971). Posteriormente se ha descrito un amplio número de TKs en diferentes organismos, desde invertebrados como la *Hydra* (Taban y Cathieni, 1979; Grimmelikhuijzen et al., 1981; Pierobon et al., 1989), moluscos (eledoisina) (Erspamer, 1949) o insectos (sialicinas) (Champagne y Ribeiro, 1994); prevertebrados como *Amphiouxus lanceolatus* (Lembeck et al., 1985) o Tunicados como *Ciona intestinalis* (Fritsch et al., 1979; Fritsch et al., 1980; O'Neil et al., 1987); hasta vertebrados (Severini et al., 2002). En este último grupo hay que destacar la amplia variedad de TKs halladas en el tegumento de los anfibios. Entre ellas, las más importantes son la fisalaemina (Erspamer et al., 1964) o la kassinina (Anastasi et al., 1977). Curiosamente la primera TK fue descrita en mamíferos, pero no se hallaron más en este grupo hasta principios de los años 80, cuando se descubrieron en extractos ácidos de espina dorsal de cerdo la neurocinina A y la neurocinina B (Kangawa et al., 1983; Kimura et al., 1983; Kimura et al., 1984). Aunque se hayan detectado TKs en cnidarios y ctenóforos, de simetría radial, estos péptidos aparecen en la mayoría de especies con simetría bilateral. El hecho de que las TKs se expresen en especies que divergieron hace millones de años nos lleva a pensar en la importancia de las mismas en la fisiología animal y su enorme éxito evolutivo.

Las TKs han sido consideradas tradicionalmente neuropéptidos, ya que la principal localización de las TKs, tanto en invertebrados como en vertebrados, es

el tejido nervioso. En mamíferos, tanto la SP como la NKA y la NKB se expresan fundamentalmente en el sistema nervioso central (Kanazawa y Jessell, 1976; Emson et al., 1980; Cooper et al., 1981; Douglas et al., 1982; Kangawa et al., 1983; Kanazawa et al., 1984; Merchanthaler et al., 1992; Goubillon et al., 2000) y en la espina dorsal (Ogawa et al., 1985; Moussaoui et al., 1992) mientras que la SP y la NKA aparecen también en el sistema nervioso periférico (Lembeck y Holzer, 1979; Holzer, 1988; Moussaoui et al., 1992; Maggi, 2000), principalmente en neuronas sensoriales primarias aferentes, aunque su presencia también se ha detectado en neuronas eferentes. Desde ellas son liberadas, en ambos casos, como neurotransmisores excitatorios (Maggi, 2000). Los sistemas más ampliamente inervados por las TKs son el genitourinario (Candenas et al., 2005), el gastrointestinal (Shimizu et al., 2008) y el respiratorio (De Swert y Joos, 2006). De hecho, la mayor fuente de TKs a nivel periférico son las terminaciones nerviosas sensibles a capsaicina que presentan el receptor TRPV1 (Holzer, 1988; Moussaoui et al., 1992). A nivel del sistema nervioso periférico también se han localizado en fibras nerviosas resistentes a capsaicina de, entre otros tejidos, las vías respiratorias, así como en el sistema nervioso entérico del aparato digestivo (Maggi, 2000), tanto en el plexo mientérico como en el plexo submucoso. En los últimos años, multitud de trabajos están demostrando que las TKs no son exclusivas del sistema nervioso y que se expresan en una amplia gama de células no neuronales, como las células del sistema inmune (Klassert et al., 2008), células musculares lisas del aparato respiratorio (Maghni et al., 2003), células del aparato reproductor femenino (Patak et al., 2003; Pintado et al., 2003), testículo (Schulze et al., 1987; Chiwakata et al., 1991) o placenta (Page et al., 2000). Además, los miembros descritos más recientemente en mamíferos, como la HK-1 (Zhang et al., 2000; Kurtz et al., 2002) y sus ortólogos humanos, EKA, EKB, EKC y EKD (Page et al., 2003) han sido descubiertos en células no neuronales. En estos tipos celulares no neuronales, la función de las TKs podría ser principalmente la de actuar como reguladores endocrinos, paracrinós o autocrinos (Pennefather et al., 2004; Candenas et al., 2005).

3.1. TAQUICININAS

Esta familia de pequeños péptidos se caracteriza por la presencia de la secuencia C-terminal amidada común *Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂* (Almeida et al., 2004; Pennefather et al., 2004; Candenas et al., 2007). Esta secuencia pentapéptida puede presentar ciertas modificaciones en determinadas TKs de invertebrados, que, generalmente, poseen una arginina amidada terminal en lugar de la metionina, denominándose en estos casos como “péptidos similares a las TKs”. Pueden aparecer excepciones a esta regla y existen “péptidos similares a las TKs” en vertebrados como las endocininas EKC y EKD, y TKs auténticas en invertebrados, como la eleldoisina (Severini et al., 2002). Las secuencias aminoácídicas de SP, NKA y NKB están conservadas en todas las especies de mamíferos, sin embargo, la de la HK-1 difiere en roedores (rata y ratón) respecto a la de humanos, tanto en la posición X del pentapéptido característico de las TKs, como en el extremo N-terminal (Tabla 1).

Tabla 1: Genes y secuencias aminoácídicas de las TKs de mamíferos.

Especie	TK	Gen	Secuencia
Mamíferos	SP	<i>Tac1/TAC1</i>	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
Mamíferos	NKA	<i>Tac1/TAC1</i>	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Mamíferos	NKB	<i>Tac2/TAC3</i>	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Rata/Ratón	HK-1	<i>Tac4</i>	Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂
Humano	HK-1	<i>TAC4</i>	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
Humano	EKC	<i>TAC4</i>	Lys-Lys-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu-NH ₂
Humano	EKD	<i>TAC4</i>	Val-Gly-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu-NH ₂

Las TKs son transcritas y traducidas en mamíferos a partir de tres genes distintos. En humanos, el gen *TAC1* (*Tac1* en otros mamíferos) (Nawa et al., 1984), se localiza en la posición cromosómica 7p21-q22 y codifica la SP, la NKA, el NPK (Tatemoto et al., 1985) y el NPy (Kage et al., 1988). Estos dos últimos péptidos son formas extendidas por el extremo N-terminal de la NKA, constituidos por 36 y 20 aminoácidos, respectivamente. Este gen presenta siete exones que generan un pre-ARN mensajero, que, por splicing alternativo, acaba generando

cuatro isoformas distintos de ARNm: la variante α , que carece del exón 6; la variante β , con la presencia de los siete exones; la variante γ , que carece del exón 4; y la variante δ , que no presenta ni el exón 4 ni el 6 (Nawa et al., 1984; Kawaguchi et al., 1986; Harmar et al., 1990). La SP se genera a partir del exón 3, por lo que se sintetiza desde cualquiera de los cuatro isoformas de *TAC1*. La NKA se crea a partir de una secuencia que se localiza en el exón 6, por lo que solo se traduce cuando los isoformas expresados son el β o el γ . El NPK aparece al traducir los exones 4, 5 y 6, por lo que se sintetiza a partir del isoformo β . Por último, el NPy se origina desde las secuencias del exón 5 y 6, apareciendo solo cuando es el isoformo γ el que es transcrito (Figura 9).

La NKB es la única TK sintetizada a partir del gen humano *TAC3* (*Tac2* en otros mamíferos). Concretamente la secuencia codificante de dicho péptido se encuentra en el exón 5 de este gen humano de 7 exones (Figura 9). El gen *TAC3* se localiza en la posición cromosómica 12q13-q21.

El gen *Tac4* fue inicialmente identificado en ratón (Zhang et al., 2000). Los genes ortólogos se descubrieron posteriormente en rata y en humano (*TAC4*) (Kurtz et al., 2002; Page et al., 2003). En humanos, este gen, localizado en la posición cromosómica 17q21.33, codifica dos formas extendidas por el extremo N-terminal de HK-1, una de 47 aminoácidos llamada EKA, y otra de 41 aminoácidos llamada EKB. Además, *TAC4* también codifica dos “péptidos similares a las TKs” como son la EKC y la EKD, donde el último aminoácido del pentapéptido común es una leucina, en lugar de la metionina característica de las TKs auténticas (Page et al., 2003; Page, 2006). Este gen tiene 5 exones que generan cuatro variantes de splicing denominadas α , β , γ y δ (Figura 9). La secuencia que codifica la EKA se encuentra en los exones 1 y 2, con la secuencia que codifica la HK-1 contenida en el exón 2. La secuencia que codifica la EKC está contenida en los exones 3 y 4 y la secuencia que codifica la EKD se encuentra solamente en el exón 4. Finalmente, la secuencia que codifica la EKB se genera mediante splicing alternativo del final del exón 1, que causa la delección de seis aminoácidos en medio de la secuencia de la EKA. Así, la variante α de *TAC4* contiene los exones 1, 2, 3, 4 y 5 y presenta dos subvariantes: $\alpha TAC4v1$, que genera EKA y EKC y $\alpha TAC4v2$ que genera EKB y EKC. La variante β presenta los exones 1, 2, 4 y 5, y codifica la EKB y la EKD (Figura 9). Las variantes γ y δ presentan los exones 1, 2, 3 y 5, y 1, 2 y 5, respectivamente, y codifican

solamente la EKB. En ratón y en rata no se han descrito variantes de splicing y el gen *Tac4* solo transcribe la HK-1 (Figura 9).

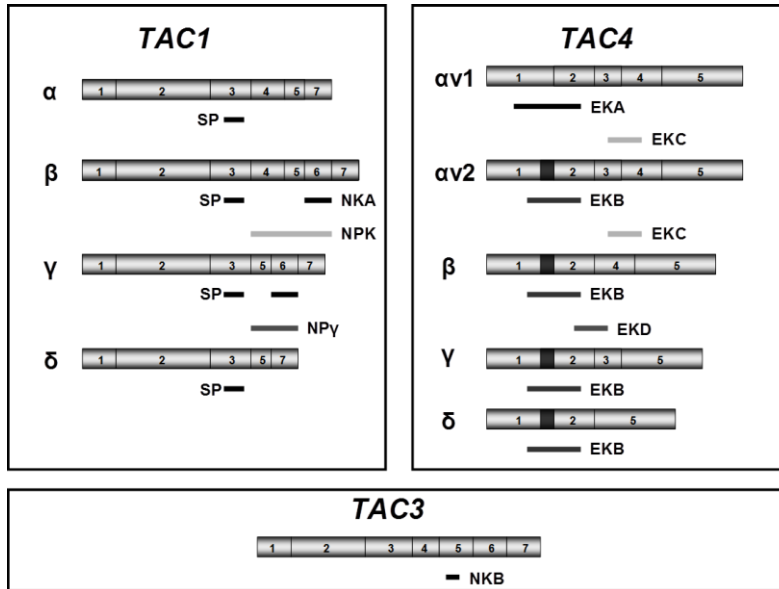


Figura 9: Esquema de los exones de los genes humanos que codifican para las TKs (Candenas et al., 2007).

La síntesis y transporte de las TKs comienza por la traducción de los ARNm maduros de los genes *TAC1*, *TAC2* y *TAC3* (Pennefather et al., 2004). Se genera un largo polipéptido denominado prepropéptido que contiene un péptido señal, una o varias copias de la TK o las TKs correspondientes a la variante de splicing en síntesis, y uno o varios espaciadores. El péptido señal permite al péptido en formación unirse y entrar al retículo endoplasmático durante la síntesis del mismo en el ribosoma y es inmediatamente cortado, permitiendo la formación del propéptido, idéntico al prepropéptido pero sin péptido señal. El propéptido es transportado al aparato de Golgi, donde se eliminan los espaciadores, liberándose los péptidos finales activos. En las neuronas, estos péptidos activos se empaquetan en gránulos secretores y se transportan por el axón hasta las terminaciones nerviosas. Sin embargo, el almacenamiento y posible liberación de las TKs en otros tipos celulares no está bien descrito (Holmgren y Jensen, 2001; Page et al., 2003; Satake y Kawada, 2006; Candenas et al., 2007).

La acción biológica de las TKs está controlada por su degradación enzimática mediante peptidasas. La endopeptidasa neutra EC 3.4.21.11, también llamada encefalinasa o NEP, es la enzima más importante del metabolismo de las TKs y está codificada por el gen *MME* localizado en la posición cromosómica 3q25.1-25.2 (Regoli et al., 1994). Muchas de las acciones descritas *in vitro* para las TKs están influenciadas por la acción de esta enzima degradadora y han de realizarse en presencia de inhibidores de la misma (Patak et al., 2003). Esta metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} pertenece a la familia de las proteínas integrales de membrana tipo II, con un corto dominio citoplasmático y un largo dominio extracelular que contiene el sitio activo (Malfroy et al., 1988). Aparece como homodímero unido no covalentemente donde cada cadena polipeptídica tiene un peso molecular aproximado de 100 kDa, tiene altos niveles de glicosilación y posee cuatro residuos de cisteína relacionados con su estructura y función (Shimada et al., 1996). Su distribución tisular es muy amplia, e incluso se han descrito en los prostasomas del semen (Fernández et al., 2002; Carlsson et al., 2006). Recientemente, se ha descrito una segunda enzima, la NEP2, que presenta una alta homología con la NEP y se expresa principalmente en los testículos y en todas las células de la espermatogénesis. La NEP2 es codificada por el gen *MMEL1* (Ikeda et al., 1999; Ghaddar et al., 2000; Ouimet et al., 2000). Los ratones knockout para NEP2 presentan una función testicular y espermática normal, pero son subfértiles porque presentan una baja tasa de fecundación y desarrollo embrionario anormal (Carpentier et al., 2004).

3.2. RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS

La acción biológica de las TKs está mediada por receptores específicos de membrana que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, concretamente a la familia 1, cuyo principal representante es la rodopsina. En mamíferos, incluyendo humanos, se han descrito tres receptores distintos con alta afinidad por las TKs que se han denominado NK₁, NK₂ y NK₃. Los tres presentan siete hélices α transmembrana hidrofóbicas con tres lazos extracelulares y tres lazos intracelulares, quedando el extremo N-terminal en el lado extracelular y el extremo C-terminal en el citoplasma celular (Figura 10) (Nakanishi, 1991; Gerard et al., 1993; Maggi, 1995; Pennefather et al., 2004; Candenas et al., 2007).

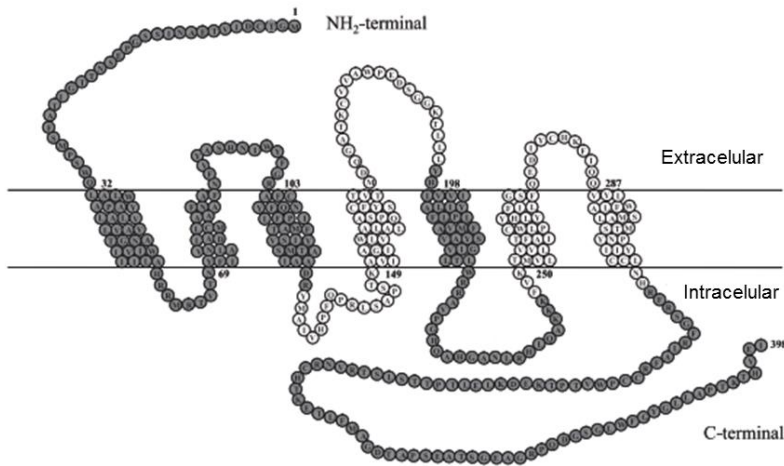


Figura 10: Esquema del receptor taquicinérgico NK₂ (modificado de Pennefather et al., 2004).

En todas las especies de mamíferos, el receptor NK₁ presenta 407 aminoácidos. Sin embargo, el receptor NK₂ tiene 402 aminoácidos en cobaya, 390 aminoácidos en rata y 398 residuos en humano, al igual que el receptor NK₃, que tiene 465, 452 y 440 aminoácidos en humano, rata y cobaya, respectivamente (Severini et al., 2002; Almeida et al., 2004).

Cada receptor taquicinérgico es codificado por un gen. El gen *TACR1* codifica el receptor NK₁, el gen *TACR2* el receptor NK₂ y el gen *TACR3* codifica el receptor NK₃ (Tabla 2). Los tres genes tienen una alta similitud estructural y contienen cinco exones separados por intrones que interrumpen la secuencia codificante en los mismos puntos, de forma que los sitios de splicing se encuentran en todos ellos en los extremos de los dominios transmembrana (Pennefather et al., 2004). La generación de variantes de splicing puede dar lugar a diferentes conformaciones de los receptores, que a su vez pueden mostrar diferencias en la afinidad por las TKs. La más estudiada es la presencia de dos isoformas generados a partir de *TACR1*, que originan una forma corta del receptor NK₁, con 96 aminoácidos menos en el extremo C-terminal y una afinidad diez veces menor por la SP que la forma extendida. La expresión de la forma corta de NK₁ parece tener relación con procesos patofisiológicos (Caberlotto et al., 2003; Patel et al., 2005; Lai et al., 2006; Gillespie et al., 2011).

Tabla 2: Genes de los receptores de las TKs en humanos.

Receptor	Gen	Localización cromosómica
NK ₁	<i>TACR1</i>	2p13.1-p12
NK ₂	<i>TACR2</i>	10q11-q21
NK ₃	<i>TACR3</i>	4q25

Todas las TKs pueden actuar como agonistas de los tres receptores taquicinérgicos, pero no todas presentan la misma afinidad por cada uno de ellos. El receptor NK₁ es activado preferentemente por la SP y la HK-1, mientras que el receptor NK₂ se une con mayor afinidad a la NKA y el receptor NK₃ a la NKB. Los neuropéptidos NPK y NPy reconocen preferentemente al receptor NK₂, aunque también presentan buena afinidad por el receptor NK₁. Por otro lado, EKB tiene preferencia por el receptor NK₁, mientras que EKC y EKD producen una activación leve del receptor NK₃ (Page et al., 2003; Pennefather et al., 2004; Candenat et al., 2007). Analizando la estructura química de las TKs, se deduce que la afinidad por el receptor NK₁ se favorece por la presencia de un residuo aromático en la posición "X" del motivo C-terminal de la TK, la presencia de dos residuos aromáticos en las posiciones 4 y 5 y la presencia de un aminoácido neutro o básico en la posición 7 desde el extremo C-terminal (Severini et al., 2002; Almeida et al., 2004). Por otro lado, los estudios tridimensionales de las TKs en solución han demostrado que todas las TKs adoptan una conformación en forma de α -hélice en la región central que puede ser importante para el reconocimiento de los receptores taquicinérgicos. Sin embargo, la SP, la NKA y la NKB muestran diferencias en su perfil hidrofóbico que podría explicar sus diferentes afinidades preferenciales por cada uno de los tres receptores taquicinérgicos. Por un lado, la SP adopta conformaciones extendidas en sus regiones C-terminal y N-terminal, mientras que la NKA solo presenta extendida la región N-terminal y la NKB adquiere una conformación plegada en ambos extremos (Young et al., 1994; Whitehead et al., 1998; Chandrashekar y Cowsik, 2003; Mantha et al., 2004).

3.3. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INTRACELULARES TRAS LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS

Los receptores taquicinérgicos se encuentran acoplados a proteínas $G_{q/11}$ que se encargan de activar a la PLC para que hidrolice el PIP_2 de la membrana en dos importantes segundos mensajeros: IP_3 y DAG. DAG se encarga de activar a PKC, que inicia una ruta de señalización basada en fosforilaciones. Por otro lado, IP_3 activa receptores localizados en los reservorios intracelulares de Ca^{2+} , favoreciendo la liberación citoplasmática del mismo. Por otra parte, la unión de las TKs a sus receptores también puede inducir despolarización de la membrana y entrada del Ca^{2+} extracelular a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L o de canales no selectivos de cationes. Todo ello conduce a un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ (Suman-Chauhan et al., 1990; Torrens et al., 1995; Magraner et al., 1997; Shintani et al., 2000; Warner et al., 2000; Lecci y Maggi, 2001; Cao et al., 2006; Kovac et al., 2006).

Los receptores taquicinérgicos también pueden acoplarse a proteínas G_s o proteínas G_i cuya actividad regula a la adenil ciclase e interfiere en los niveles intracelulares de AMPc. La vía de señalización activada depende del receptor y también puede ser dependiente de la TK que active a cada uno de los receptores taquicinérgicos. Así, el receptor NK_1 , que une con alta afinidad tanto a SP como a NKA, no genera la misma respuesta si es una u otra la TK que se une al mismo, ya que, si es la SP, aumentan los niveles intracelulares de Ca^{2+} , de IP_3 y de AMPc, mientras que cuando es la NKA la que activa al receptor NK_1 , solo aumentan los niveles de Ca^{2+} y de IP_3 . Este hecho puede deberse a la existencia de distintos isoformas, como los descritos anteriormente para el receptor NK_1 , o puede deberse a que los sitios de unión de cada una de las TKs presentan diferencias y/o son capaces de inducir distintas conformaciones en los receptores (Rosenkilde et al., 1994; Sagan et al., 1996; Palanche et al., 2001; Lecat et al., 2002; Alves et al., 2006).

3.4. PAPEL DEL SISTEMA TAQUICINÉRGICO EN EL CONTROL PERIFÉRICO DE LA REPRODUCCIÓN

El posible papel que pueden desempeñar tanto las TKs como los receptores taquicinérgicos en los sistemas reproductores masculino y femenino no está definido de la misma manera para ambos sistemas. Mientras que los estudios llevados a cabo en testículo definen someramente la presencia o expresión de determinados componentes del sistema taquicinérgico y su posible función, los hallazgos en el aparato reproductor femenino analizan en mayor profundidad el papel de las TKs en la función uterina (Pinto et al., 1999; Candenas et al., 2001; Cintado et al., 2001; Pinto et al., 2001; Crane et al., 2002; Patak et al., 2003; Pennefather et al., 2004; Pintado et al., 2003; Pinto et al., 2009; Pinto et al., 2015). En esta Tesis Doctoral nos centraremos en la descripción del papel de las TKs en el sistema reproductor masculino.

Además de en determinadas fibras nerviosas que inervan el testículo, la SP se ha detectado en las células de Leydig de diversas especies (Schulze et al., 1987; Angelova y Davidoff, 1989; Angelova et al., 1991a; Kulkarni et al., 1992; Middendorff et al., 1993). En estas células, cultivadas de forma individual, también se ha demostrado la presencia del ARNm de los genes *Tac1*, *TACR1* y *TACR2* (Chiwakata et al., 1991). La SP se ha detectado en las células de Leydig de rata mediante estudios inmunohistoquímicos, demostrándose que su expresión disminuye al administrar estrógenos y aumenta con la testosterona (Ortega et al., 2004; Ortega et al., 2006). En testículos donde se han eliminado selectivamente las células de Leydig, se sigue detectando la presencia de SP y NKA, lo que sugiere que otras células testiculares distintas también deben sintetizar TKs (Debeljuk et al., 2003). Estas células pueden ser las células de Sertoli, ya que se ha observado la expresión de *Tac1* en cultivos de este tipo celular. La transcripción de este gen en estas células se produce desde la etapa prepuberal hasta la edad adulta (Debeljuk et al., 1995). También se ha descrito la presencia de la SP en espermatidas y en espermatogonias pero con una intensidad mucho menor (Kulkarni et al., 1992). En un estudio más reciente, no se detectó la SP en los túbulos seminíferos de rata (Artico et al., 2007). La presencia de la SP también se ha demostrado en espermatozoides humanos, de toro y de rata, al igual que en plasma seminal (Sastry et al., 1991).

Desde el punto de vista funcional, la adición de SP, NKA o NPK a fragmentos testiculares o a células de Leydig aisladas provoca en este tipo celular un descenso de la liberación de testosterona basal y de la inducida por LH o hCG (Angelova et al., 1991b; Angelova et al., 1991c; Debeljuk y Bartke, 1994). También se ha descrito la reducción del número de receptores de LH en las células de Leydig como respuesta a la exposición a SP (Kanchev et al., 1995). Este efecto debe estar mediado por los receptores taquicinérgicos (Chiwakata et al., 1991). En las células de Sertoli, la adición de SP, NKA o NPK estimula la liberación de lactato y transferrina, factores importantes para el correcto desarrollo meiótico de la espermatogénesis. Si esta adición se realiza en presencia de testosterona, NKA induce también la liberación de estrógenos desde las células de Sertoli, lo que sugiere que deben activar la aromatasa mediante algún mecanismo no descrito (Rao et al., 1995). Es curioso que las TKs produzcan un efecto inhibitorio en las células de Leydig y sin embargo provoquen un efecto estimulador en las células de Sertoli (Debeljuk et al., 2003). Por otro lado, la inhibición de los receptores taquicinérgicos provoca una disminución de la espermatogénesis y cambios histopatológicos en el testículo, principalmente mediados por el receptor NK₃, en perros (Noritake et al., 2011). Al tratarse de tratamientos sistémicos, no queda del todo claro en este estudio que los cambios observados se deban a efectos a nivel periférico o del sistema nervioso central (Noritake et al., 2011).

En espermatozoides humanos, donde se ha descrito la presencia de SP, también se ha puesto de manifiesto que la adición de dicha TK estimula la movilidad espermática a bajas dosis durante 4 horas. A dosis mayores, la SP disminuye la movilidad (Sastry et al., 1991).

4. SISTEMA DE LA KISSPEPTINA/KISS1R

En 1996 se descubrió que el descenso en la expresión de un ARNm en las células de melanoma provocaba la metástasis de estas células cancerígenas. La expresión de este ARNm era esencial para que las células cancerígenas no se convirtieran en malignas y pudieran comenzar a desencadenar mecanismos de migración. El gen que codifica este ARNm fue llamado *KISS1*, por lo que fue catalogado como un gen supresor de tumores (Lee et al., 1996). La transfección de *KISS1* en células cancerígenas derivadas de cáncer de mama demostró nuevamente la capacidad inhibitoria de metástasis de este producto génico (Lee y Welch, 1997). Por otro lado, en la búsqueda de nuevos receptores asociados a proteínas G se descubrió un receptor huérfano llamado GPR54 (Lee et al., 1999). Aunque este receptor tenía una alta homología con el receptor humano de la galanina GALR2, ningún péptido conocido hasta ese momento era capaz de activarlo en cultivos celulares transfectados con este receptor (Bloomquist et al., 1998). Sin embargo, la adición de extractos placentarios a estas líneas celulares sí provocó un aumento de $[Ca^{2+}]_i$. Mediante cromatografía líquida se purificó el péptido responsable de la activación de este receptor y resultó ser el producto de expresión del gen *KISS1*, que en principio se bautizó como metastina (Ohtaki et al., 2001). Este mismo estudio describió por PCR cuantitativa los tejidos donde los transcritos de *KISS1* y del receptor GPR54 presentaban un mayor nivel de expresión. *KISS1* se observó en altos niveles en placenta y testículo y en niveles moderados en páncreas, hígado e intestino delgado, mientras que GPR54 se localizó principalmente en placenta y páncreas y presentó una expresión moderada en testículo, bazo, leucocitos de sangre periférica y ganglios linfáticos.

4.1. KISSPEPTINAS

Las kisspeptinas constituyen una familia de péptidos relacionados estructuralmente codificados todos ellos por el gen *KISS1*. Dicho gen se localiza en el cromosoma 1q32.1 (West et al., 1998). Curiosamente, esta región del cromosoma 1 suele perderse en los cánceres de mama en estadios avanzados (Lee y Welch, 1997). El gen *KISS1* humano se compone de cuatro exones, siendo los dos primeros no codificantes (West et al., 1998). También se ha propuesto la posibilidad de que *KISS1* presente sólo tres exones, de forma que solo el primer

exón sería no codificante (Luan et al., 2007). En humanos, todas las kisspeptinas descritas derivan de un único precursor transcrito desde los dos últimos exones del gen *KISS1*. Este precursor o preprokisspeptina tiene 145 aminoácidos, conteniendo un péptido señal de 19 aminoácidos, dos sitios de corte dibásico en los aminoácidos 57 y 67 y un sitio de corte final entre los aminoácidos 121 y 124. El péptido generado entre los aminoácidos 68 y 121 del prepropéptido contiene 54 aminoácidos, es de naturaleza ácida y se conoce como kisspeptina-54. Este péptido es el que tradicionalmente se denominó metastina. Otras formas de kisspeptina de menor peso molecular descritas son la kisspeptina-14, que contiene la secuencia comprendida entre el aminoácido 108 y 121; la kisspeptina-13, con la secuencia entre los aminoácidos 109 y 121; y la kisspeptina-10, con la secuencia localizada entre los aminoácidos 112 y 121 (Figura 11). Todos estos péptidos comparten el extremo C-terminal, el cual finaliza con la secuencia Arg-Phe, susceptible de amidación. De este modo, se pone de manifiesto que el extremo N-terminal del péptido no es necesario y que solo los últimos 10 aminoácidos son necesarios para llevar a cabo su acción biológica. De todas maneras, existe mucha controversia sobre si los miembros más pequeños de la familia de la kisspeptina se generan endógenamente por diferentes procesos proteolíticos o si son generados por degradación del péptido mayor, la kisspeptina-54 (Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001; Bilban et al., 2004; Colledge, 2008). Las kisspeptinas con el extremo C-terminal libre sin amidar tienen una acción biológica mucho menor (Ohtaki et al., 2001). Las secuencias descritas para la kisspeptina-14 en diversas especies se muestran en la Tabla 3. Se observa que el último aminoácido fenilalanina solo está presente en humanos y en chimpancés.

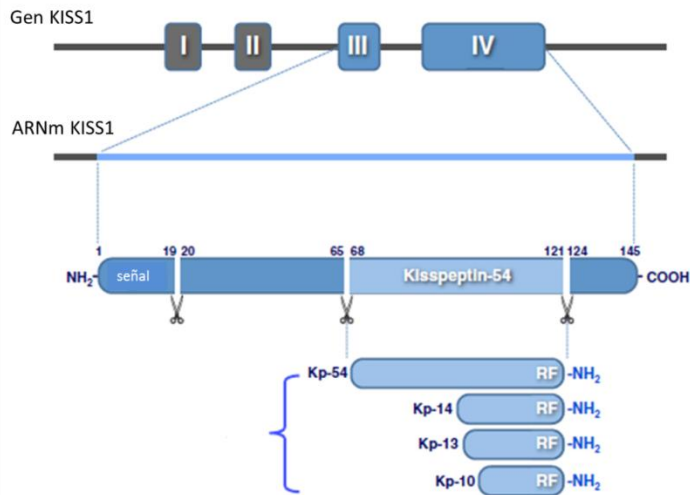


Figura 11: Esquema del gen *KISS1* y de la generación de las kisspeptinas a partir de su transcripción (modificado de Pinilla et al., 2012).

Tabla 3: Comparación de las secuencias de la kisspeptina-14 entre especies (Colledge, 2008).

Especie	Secuencia kisspeptina-14
Humano	Asp-Leu-Pro-Asn-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH ₂
Chimpancé	Asp-Leu-Pro-Asn-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH ₂
Ratón	Asp-Leu-Ser-Thr-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH ₂
Rata	Asp-Met-Ser-Thr-Ala-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH ₂
Oveja	Asp-Val-Ser-Thr-Ala-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH ₂

4.2. RECEPTOR KISS1R

El receptor GPR54 fue descubierto al amplificar una librería de ADNc de cerebro de rata con primers de secuencias conservadas de la familia de receptores de membrana acoplados a proteínas G similares a la rodopsina (Lee et al., 1999). Posteriormente, su ortólogo humano fue clonado y se nombró AXOR12 o hOT7T175 (Muir et al., 2001). Hasta que no se descubrió que este receptor era activado por las kisspeptinas, no empezó a denominarse KISS1R (Clements et al., 2001; Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001). El gen que codifica este receptor tiene cinco exones y cuatro intrones y su localización cromosómica en humanos es 19p13.3. Al analizar el promotor del gen mediante estudios de mutagénesis dirigida, se han localizado en su extremo 5' tres sitios consenso SP1 implicados en la expresión del mismo. Del mismo modo, se ha descrito un elemento sensible a estrógenos que actuaría como represor de la expresión génica del gen *KISS1R* (DeFino et al., 2010). En humanos, este gen codifica una proteína de 398 aminoácidos mientras que los homólogos de rata y de ratón tienen 396 y 395 aminoácidos respectivamente (Kaiser y Kuohung, 2005; Colledge, 2008). La secuencia aminoacídica está muy conservada entre especies, con un 95% de homología entre la rata y el ratón y un 82% entre el ratón y el humano, llegando al 98% en los segmentos transmembrana (Kaiser y Kuohung, 2005). La proteína KISS1R se compone de siete dominios transmembrana con tres lazos extracelulares y otros tres intracelulares, presentando el extremo N-terminal hacia la cara extracelular y el extremo C-terminal hacia la cara intracelular (Figura 12). Hasta la fecha, no hay datos que pongan de manifiesto una posible homodimerización o heterodimerización de este receptor consigo mismo o con algún otro receptor (Pinilla et al., 2012).

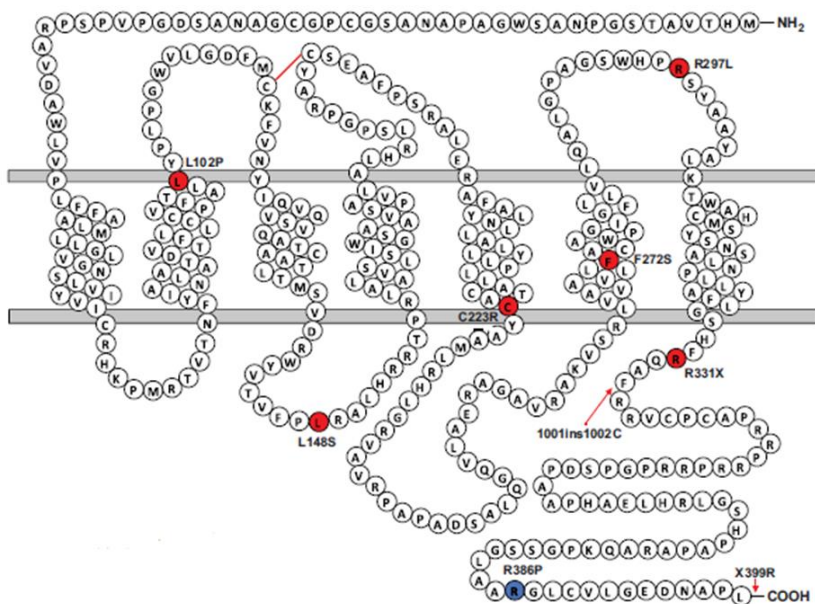


Figura 12: Esquema del receptor KISS1R. En rojo se representan las mutaciones que inactivan el receptor y en azul las que lo activan (modificado de Pinilla et al., 2012).

4.3. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INTRACELULARES TRAS LA ACTIVACIÓN DE KISS1R

El receptor KISS1R se acopla a proteínas $G_{q/11}$, probablemente a través de su segundo lazo intracelular (Seminara et al., 2003; Wacker et al., 2008). Esta proteína $G_{q/11}$ se encarga de activar la PLC, que, como ya hemos descrito, hidroliza PIP_2 en IP_3 y DAG. El IP_3 provoca la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares de este ion (Kotani et al., 2001; Stafford et al., 2002). El DAG activa la PKC, la cual fosforila a las MAPKs, como ERK1/2 y p38 (Kotani et al., 2001; Ringel et al., 2002). Las MAPKs activadas por esta ruta pueden ser las responsables de los efectos antimetastásicos de la kisspeptina (Castaño et al., 2009). Según el tipo celular estudiado, el conjunto de quinasas activados por esta vía es variable (Kotani et al., 2001; Ringel et al., 2002; Masui et al., 2004; Castellano et al., 2006a). También se ha visto que en las células transfectadas para la expresión de este receptor se incrementa la síntesis de ácido

araquidónico (Kotani et al., 2001). Por otro lado, la sobreexpresión de KISS1 reduce la expresión de NFkB, factor de transcripción de la metaloproteasa de matriz MMP-9. Por tanto, se produce menos cantidad de esta metaloproteasa, hecho que puede prevenir la propagación tumoral (Yan et al., 2001). En otros estudios, la expresión de la kisspeptina se ha relacionado con la inducción de apoptosis (Becker et al., 2005; Navenot et al., 2009). Además de la unión a proteínas G, se ha descrito que KISS1R tiene una íntima relación con la subunidad catalítica de la fosfatasa de serinas y treoninas PP2A (Evans et al., 2008) y con determinadas β -arrestinas (Pampillo et al., 2009; Szereszewski et al., 2010). Por último, los mecanismos de desensibilización de KISS1R parecen estar relacionados con la internalización de los receptores activados tras la unión del ligando (Pampillo et al., 2009). Lo que parece claro es que la activación de KISS1R no desencadena la activación del sistema adenil ciclasa/AMPc/PKA (Pinilla et al., 2012).

4.4. PAPEL DEL SISTEMA KISS/KISS1R EN EL CONTROL CENTRAL DE LA REPRODUCCIÓN. COLOCALIZACIÓN CON LA NKB EN EL NÚCLEO ARQUEADO.

La correlación entre la presencia de mutaciones puntuales en *KISS1R* y *KISS1* y los casos de hipogonadismo hipogonadotrofo en humanos puso de manifiesto el papel clave de este sistema en la regulación de la función reproductiva (De Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003; Lanfranco et al., 2005; Topaloglu et al., 2012). Por otro lado, las deficiencias reproductivas de los ratones knockout para *KISS1R* (Funes et al., 2003; Seminara et al., 2003) y para *KISS1* (D'Anglemont de Tassigny et al., 2007; Lapatto et al., 2007; Colledge, 2009) demostraron la funcionalidad de estos genes en el mantenimiento de la reproducción. Tanto en humanos como en los ratones modificados genéticamente no existían deficiencias a nivel hipofisario, donde el contenido de GnRH permanecía inalterado. Estos hechos hacen pensar que el sistema KISS1/KISS1R actúa como regulador de la liberación de GnRH a nivel hipotalámico (Pinilla et al., 2012).

Mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* se ha demostrado la presencia de dos poblaciones neuronales que expresan kisspeptina en el

hipotálamo (Cravo et al., 2011). Una de ellas se localiza en el núcleo arqueado (denominado núcleo infundibular en humano) (Estrada et al., 2006; Franceschini et al., 2006; Decourt et al., 2008; Clarkson et al., 2009; Hrabovszky et al., 2010; Gottsch et al., 2011; Bosch et al., 2012) y en ella, la kisspeptina colocaliza con la NKB, el receptor NK₃ y el opioide dinorfina, por lo que esta población se ha llamado KNDy (Goodman et al., 2007; Lehman et al., 2010). La otra se localiza en el núcleo anteroventral periventricular del hipotálamo (Smith et al., 2005; Adachi et al., 2007; Clarkson et al., 2009). Esta segunda región presenta dimorfismo sexual, ya que en hembras aparece un número mayor de neuronas positivas para kisspeptina en esta región que en machos (Clarkson y Herbison, 2006; Kauffman et al., 2007). Esta segunda población presenta una amplia variabilidad de tamaño entre especies, siendo muy amplia en cerdo, cobaya y ratón (Clarkson y Herbison, 2006; Tomikawa et al., 2010; Bosch et al., 2012) y de tamaño reducido en oveja, caballo, primates y ratas (Estrada et al., 2006; Rometo et al., 2007; Decourt et al., 2008; Desroziers et al., 2010). Del mismo modo, la localización también es variable, siendo destacable su presencia en el área preóptica en oveja (Franceschini et al., 2006; Backholer et al., 2009). En cuanto al receptor KISS1R, sólo se expresa en las neuronas liberadoras de GnRH y no en el núcleo arqueado ni anteroventral paraventricular (Herbison et al., 2010).

Diversos estudios han demostrado la existencia de conexiones neuronales directas entre las neuronas del núcleo arqueado y del núcleo anteroventral paraventricular con las neuronas liberadoras de GnRH, aunque el número de estas uniones es bajo, por lo que la kisspeptina podría ejercer un papel directo, indirecto o incluso no sináptico (Clarkson y Herbison, 2006; Ramaswamy et al., 2008; Iijima et al., 2011; Matsuyama et al., 2011; Uenoyama et al., 2011; Yeo y Herbison, 2011).

Este sistema tiene una enorme implicación en el inicio de la pubertad y en el mantenimiento de la pulsatilidad de la liberación de la GnRH.

4.4.1. COLOCALIZACIÓN KISSPEPTINA/NKB EN LAS NEURONAS DEL NÚCLEO ARQUEADO

Se han descrito algunos casos de hipogonadismo hipogonadotropo en humanos que cursan con mutaciones en los genes codificantes para NKB y el receptor NK₃ y que presentan un fenotipo similar a los vistos para las mutaciones

en KISS1R y KISS1 (Topaloglu et al., 2009). Como hemos comentado anteriormente, las neuronas del núcleo arqueado que presentan kisspeptina, también expresan NKB y dinorfina en varias especies, constituyendo las llamadas neuronas KNDy (Goodman et al., 2007; Navarro et al., 2009; Hrabovszky et al., 2010; Lehman et al., 2010; Ramaswamy et al., 2010; Wakabayashi et al., 2010; Navarro et al., 2011a). En oveja se localiza la NKB solo tras la pubertad (Nestor et al., 2012). Por otro lado, el receptor NK₃ se detectó inicialmente en una pequeña proporción de las neuronas liberadoras de GnRH en rata (Krajewski et al., 2005), aunque posteriormente se ha descrito su presencia de forma más abundante en las neuronas del núcleo arqueado de ratón y oveja (Navarro et al., 2009; Amstalden et al., 2010; Navarro et al., 2011a). En esta última especie no se observó su presencia en las neuronas liberadoras de GnRH, algo que después se demostró también en ratón (Amstalden et al., 2010; Navarro et al., 2011a). Del mismo modo, se ha demostrado que las neuronas KNDy también expresan el receptor de estrógenos Er α (Burke et al., 2006; Rance, 2009; Lehman et al., 2010; Rance et al., 2010). Las neuronas KNDy están muy interconectadas, presentando interconexiones y autosinapsis entre ellas (Krajewski et al., 2010), por lo que la NKB puede ser liberada para ejercer su función de forma paracrina sobre otras neuronas de la misma población neuronal donde es sintetizada, potenciando la liberación de la kisspeptina para que, a su vez, produzca la liberación de GnRH (Billings et al., 2010; Goodman et al., 2013; Goodman et al., 2014; Wakabayashi et al., 2013). Del mismo modo, aunque no se haya demostrado la presencia de los receptores NK₁ y NK₂ en estas células, se ha demostrado, empleando antagonistas específicos para cada uno de los receptores taquicinérgicos, que la acción paracrina de la NKB también involucra a estos receptores (De Croft et al., 2013).

El efecto directo que puede tener la NKB en la liberación de GnRH y gonadotropinas genera controversia ya que los estudios realizados no son concluyentes entre sí. Mientras que determinados trabajos no detectan cambios en la cantidad de LH circulante tras la administración de NKB o de senktide, un agonista específico del receptor NK₃, en ratones macho (Corander et al., 2010), en ratas ovariectomizadas con o sin suplementación estrogénica (Sandoval-Guzmán y Rance, 2004; Navarro et al., 2009; Kinsey-Jones et al., 2012; Grachev et al., 2012; Grachev et al., 2014) y en explantes primarios de hipotálamo de rata (Corander et al., 2010), otras publicaciones demuestran un aumento de LH

plasmático tras el tratamiento también en ratones macho (Navarro et al., 2011a; García-Galiano et al., 2012), en oveja adulta durante la fase folicular del ciclo (Billings et al., 2010), en monos (Ramaswamy et al., 2010), o en cortes cerebrales (Gaskins et al., 2013) o en ratas ovariectomizadas con suplementación estrogénica, siendo la respuesta más elevada en condiciones similares al proestro que al diestro (Navarro et al., 2011a; Navarro et al., 2011b). En ningún caso se han observado cambios en los niveles de FSH circulantes (Ruiz-Pino et al., 2015). Esta amplia variabilidad puede deberse a que la posible acción de la NKB sobre la liberación de GnRH sea dependiente de un ambiente hormonal específico o que existan amplias diferencias entre especies o entre géneros para esta respuesta (Pinilla et al., 2012). En este sentido, un estudio realizado en la línea celular derivada de neuronas liberadoras de GnRH llamada GT1-7 donde se expresa el receptor NK₃, ha puesto de manifiesto un efecto bifásico de la NKB, ya que una breve exposición a NKB provoca la liberación de GnRH mientras que una exposición prolongada la inhibe (Glidewell-Kenney et al., 2013). Por otro lado, en ratones knockout para KISS1R no se observa en ningún caso algún efecto de la NKB, por lo que su posible acción tiene que producirse antes de la activación de este receptor en las neuronas liberadoras de GnRH (García-Galiano et al., 2012).

Al igual que ocurre en el caso de la kisspeptina, la transcripción de la NKB sufre una retroalimentación negativa por efecto de las hormonas sexuales esteroideas (Navarro et al., 2009; Rance et al., 2010; Navarro et al., 2011a). Por otro lado, recientemente se ha demostrado que la SP y la NKA también son capaces de inducir la liberación de gonadotropinas a través de los receptores NK₁ y NK₂ (Ruiz-Pino et al., 2015).

Por último, la dinorfina, contrariamente a lo expuesto para la NKB, ejerce un papel inhibitorio sobre la liberación basal de LH en ratones y ovejas (Goodman et al., 2004; Navarro et al., 2009; Wakabayashi et al., 2010). En ratas es incluso capaz de inhibir la liberación de LH provocada por la administración de kisspeptina (Pinilla et al., 2012).

4.5. PAPEL DEL SISTEMA KISS/KISS1R EN EL CONTROL PERIFÉRICO DE LA REPRODUCCIÓN

Como acabamos de describir, el sistema de la kisspeptina y el receptor KISS1R ejerce un papel esencial en el control de la reproducción y su principal efecto se lleva a cabo a nivel del sistema nervioso central. Sin embargo, estas proteínas ejercen también un papel a nivel periférico, actuando sobre los sistemas reproductores tanto masculino como femenino. Estudios recientes han demostrado que la kisspeptina y el receptor KISS1R se localizan en diversos órganos y tipos celulares del sistema reproductor femenino, como el oviducto, el endometrio uterino, el ovario y las células de la granulosa (Castellano et al., 2006b; Gaytán et al., 2007; Gaytán et al., 2009; Cejudo-Román et al., 2012; García-Ortega et al., 2014). Teniendo en cuenta los objetivos de esta Tesis Doctoral, nos centraremos en los estudios llevados a cabo en el aparato reproductor masculino.

Desde el estudio de Ohtaki et al. (2001), donde ya se puso de manifiesto la expresión de KISS1 y KISS1R en testículo, muchos estudios han intentado ahondar en la expresión y la función de este sistema en las gónadas masculinas, obteniéndose resultados contradictorios en algunos casos. Mediante inmunohistoquímica, la kisspeptina se ha localizado en las células de Leydig en ratón y rata (Anjum et al., 2012; Pinilla et al., 2012; Mei et al., 2013; Hsu et al., 2014; Salehi et al., 2015; Wang et al., 2015) pero no en mono (Tariq et al., 2013). Varios de los estudios realizados en ratón han demostrado que la kisspeptina en células de Leydig se expresa a altos niveles en el momento del nacimiento, disminuye durante la prepubertad, aumenta en la pubertad, disminuye nuevamente durante la edad fértil y se dispara con la senescencia del ratón (Anjum et al., 2012; Mei et al., 2013; Salehi et al., 2015; Wang et al., 2015). Por otro lado, solo algunos estudios realizados en murinos han demostrado la presencia de kisspeptina en las células del túbulo, bien en células germinales primordiales (Anjum et al., 2012), en espermatidas redondas (Mei et al., 2013) o en los restos citoplasmáticos de las espermatidas elongadas (Hsu et al., 2014). Del mismo modo, en mono se ha observado inmunorreactividad en espermatoцитos y espermatidas (Tariq et al., 2013). Curiosamente, el estudio de Mei et al. (2013) utiliza ratones transgénicos donde se ha añadido al gen *KISS1*

el gen señalizador *LacZ* para observar los sitios donde se produce su expresión. La transcripción del gen se visualiza en las células de Leydig y en las espermátidas redondas del túbulo, pero mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos que permiten localizar la proteína, solo se detecta señal en las células de Leydig, lo que indica que en los túbulos debe haber una inhibición de la traducción. Por último, también se ha demostrado la localización de la kisspeptina en el epitelio del epidídimo del ratón (Hsu et al., 2014). En ningún caso se ha observado la presencia de kisspeptina en las células de Sertoli (Wahab et al., 2016). El receptor KISS1R también se ha localizado en las células de Leydig y en células del interior del túbulo seminífero de ratón, concretamente en espermátidas, y no se detecta en espermatogonias, espermatocitos ni en células de Sertoli (Mei et al., 2013; Hsu et al., 2014). En espermatozoide de ratón se ha descrito la presencia del receptor en la región acrosomal (Hsu et al., 2014). Sin embargo, en mono, la expresión de KISS1R aparece en las células de Sertoli y en espermatocitos y no en las células de Leydig (Tariq et al., 2013). Por último, la línea celular tumoral derivada de células de Leydig de ratón denominada MA-10 expresa KISS1R pero no kisspeptina (Mei et al., 2013).

En cuanto a la posible función que ejerce la kisspeptina sobre el testículo también hay controversia. En primer lugar, es difícil asegurar o definir que los efectos observados al inyectar kisspeptina en determinados organismos modelo son solo consecuencia de la acción de la misma sobre las gónadas y no derivan de un efecto central sobre el hipotálamo. Aun así, hay trabajos que defienden que la kisspeptina tiene una acción directa sobre el testículo. Thompson et al. (2006) detectan un aumento de testosterona muy elevado en plasma mientras que el ascenso de LH no es tan elevado al inyectar subcutáneamente kisspeptina en ratas. Por otro lado, si en mono se inyecta una dosis de kisspeptina se observa también un aumento de testosterona y LH, pero este efecto no se produce si se añade anteriormente un antagonista de la GnRH. Sin embargo, si se inyectaba hCG, capaz de provocar un aumento de la testosterona, su efecto se veía potenciado si se introducía conjuntamente con kisspeptina (Irfan et al., 2014). Algo similar se ha observado en rata (Pinilla et al., 2012). En apoyo a la teoría del efecto directo de la kisspeptina sobre el testículo, se ha observado que la inyección intravenosa durante 24 horas de kisspeptina en monos provoca un aumento de LH durante las dos primeras horas, mientras que el aumento de testosterona se mantiene durante todo el tiempo del tratamiento (Ramaswamy et

al., 2007). En este sentido, la orquidectomía en ratón genera un aumento elevado de LH circulante pero no de kisspeptina, lo que sugiere que parte de la kisspeptina en plasma puede tener un origen gonadal y puede estar regulada por la LH en las células de Leydig (Salehi et al., 2015). En contraposición, también hay varios estudios que no encuentran relación entre la función testicular y la kisspeptina. En primer lugar, varios trabajos han demostrado que una exposición crónica a kisspeptina provoca la degeneración del testículo y la inhibición de la espermatogénesis en rata (Thompson et al., 2006; Thompson et al., 2009; Ramzan y Qureshi, 2011). Este efecto es reducido en parte si las ratas son pretratadas con antagonistas de la GnRH (Ramzan et al., 2013). Del mismo modo, la línea celular de células de Leydig immortalizadas MA-10 no presenta respuesta a kisspeptina sintetizando hormonas por sí misma ni potenciando el efecto de la hCG (Mei et al., 2013). Tampoco se ha visto síntesis de testosterona en explantes de testículo o en cultivos primarios de células de Leydig en ratón, ni en monos tratados con kisspeptina o con antagonistas de KISS1R (Mei et al., 2013; Hsu et al., 2014; Huma et al., 2014; Tariq y Shabab, 2017). En espermatozoides de ratón, donde se ha demostrado la presencia de KISS1R, la kisspeptina provoca un aumento de $[Ca^{2+}]_i$. Del mismo modo, si los espermatozoides de ratón son capacitados in vitro con kisspeptina, su capacidad fecundante aumenta, al igual que disminuye cuando se añaden antagonistas de KISS1R (Hsu et al., 2014). En este sentido, y aunque no podamos definir el origen de la kisspeptina, en humanos con infertilidad se han detectado niveles menores de kisspeptina en plasma que en aquellos que son plenamente fértiles. Este hecho es independiente del origen de la patología seminal que provoca la infertilidad (Ramzan et al., 2015).

III. METODOLOGÍA



1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Esta Tesis Doctoral se engloba dentro del Proyecto de Excelencia 2008 de la Junta de Andalucía titulado “Papel de las taquicininas en la regulación de la función espermática humana: mecanismos de señalización”. Dicho Proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética del CSIC con fecha 4 de agosto de 2008. Las muestras de semen fueron obtenidas a partir de donantes con fertilidad probada que participaron en el programa de donación del Instituto Valenciano de Infertilidad de Sevilla (IVI Sevilla). Las muestras de FF se obtuvieron de las punciones ováricas de donantes de óvulos realizadas en IVI Sevilla. Las placentas fueron proporcionadas por el Dr. Enrique Poblador del Hospital Infanta Luisa de Sevilla. Los úteros fueron obtenidos a partir de pacientes sometidas a histerectomía en el Hospital Universitario de Canarias y en el Hospital La Colina, ambos con sede en Tenerife. Todos los pacientes aprobaron el uso de dichos materiales biológicos en este estudio mediante la firma del correspondiente consentimiento informado.

2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SEMEN

Los eyaculados se recogieron tras 3-5 días de abstinencia sexual y fueron procesados inmediatamente tras su licuefacción. En primer lugar se realizó un análisis microscópico de la muestra. Para ello, se examinaron gotas de 5 µl de semen fresco en un microscopio de contraste de fases, usando una cámara Makler de conteo celular. De acuerdo a las recomendaciones de la OMS de 1999 y de 2010, se calculó la concentración y la movilidad de todas y cada una de las muestras empleadas en esta Tesis. Para la caracterización de cada muestra se analizaron al menos dos gotas y un mínimo de 200 células por gota.

Para la capacitación espermática, las muestras se lavaron y se concentraron mediante una centrifugación a 400 g durante 10 minutos con medio de cultivo llamado mHTF (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EEUU), de composición similar a la del fluido tubárico humano natural y suplementado con 5% de albúmina humana. Los pellets se reconstituyeron en 1 ml de medio mHTF fresco. Las suspensiones espermáticas resultantes fueron nuevamente centrifugadas sobre un gradiente de densidad de Percoll (Spermgrad-125, Vitrolife, Kungsbacka, Suecia) de tres capas (95:70:45) durante 20 minutos a 400 g. Tras la recuperación de la capa más profunda del tubo, que contiene los espermatozoides de mayor movilidad, éstos se lavaron nuevamente en 2 ml de mHTF fresco a 400 g durante 15 minutos. Se recogió el pellet y se procedió a realizar un swim-up durante 1 h a 37°C para, posteriormente, recuperar el sobrenadante donde se encuentran los espermatozoides móviles. Finalmente, se volvió a evaluar la concentración y la movilidad espermática.

3. EXTRACCIÓN DE ARN Y RETROTRANSCRIPCIÓN A ADN_c. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

3.1. EXTRACCIÓN DE ARN Y RETROTRANSCRIPCIÓN A ADN_c

La extracción del ARN se realizó a partir de mezclas de 5-10 muestras distintas de espermatozoides tras su capacitación. La lisis y homogenización de las mismas se llevó a cabo mediante 1 ml de TriReagent (Sigma) en hielo durante 10 minutos. Tras este tiempo, llevamos a cabo la extracción del ARN siguiendo las instrucciones del kit Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research Corporation, CA, EEUU). En primer lugar, añadimos 1 ml de etanol absoluto a la extracción en TriReagent y mezclamos bien ayudándonos de un vórtex. Cargamos esta mezcla sobre una columna Zymo-Spin IIC dispuesta en un tubo colector y centrifugamos 30 segundos a 14000 g. Descartamos el tubo colector y disponemos la columna sobre uno limpio. Añadimos 400 µl de solución de lavado de ARN y volvemos a centrifugar en las mismas condiciones, descartando de nuevo el tubo colector. Posteriormente añadimos 80 µl de una solución de ADNasa I e incubamos durante 15 minutos a 37°C con el fin de eliminar el ADN genómico. Centrifugamos 30 segundos a 14000 g, añadimos 400 µl de solución de prelavado de ARN y volvemos a centrifugar en las mismas condiciones, descartando de nuevo el tubo colector. A continuación, añadimos 700 µl de tampón de lavado de ARN y centrifugamos dos minutos a 14000 g. Volvemos a descartar el tubo colector y disponemos la columna en un tubo libre de ARNasas. Finalmente, añadimos 50 µl de agua libre de ARNasa y ADNasa y centrifugamos durante 30 segundos para obtener el ARN eluido. Calculamos la concentración de ARN obtenida por espectrofotometría y la pureza de la muestra mediante el ratio de absorbancia a 260/280 nm.

La síntesis del ADN_c por retrotranscripción se realizó utilizando el kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen, Venlo, Holanda). Se añade 1 µl de hexanucleótidos a 12 µl de la solución de ARN purificado y a continuación se calienta a 65°C durante 5 minutos. Pasado este tiempo, añadimos 7 µl de la mezcla necesaria para la retrotranscripción en hielo, compuesta por tampón de

síntesis de ADNc con $MgCl_2$, RNAGuard o inhibidor de las ARNasas, desoxinucleótidos trifosfatos y una enzima para la retrotranscripción o transcriptasa reversa, la MMLV. Para una correcta síntesis del ADNc, se incubó la mezcla 10 minutos a 25°C, luego 60 minutos a 50°C y finalmente 3 minutos a 85°C. Subimos el volumen hasta 100 μ l y lo guardamos a -20°C para su posterior utilización en los experimentos de PCR.

3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Diseñamos, utilizando el programa Primer 3, parejas de primers de oligonucleótidos específicos para amplificar los transcritos de *TACR1*, *TACR2*, *TACR3*, *TAC1*, *TAC3*, *TAC4*, los isoformas α , β , γ y δ de *TAC1* y *TAC4*, *MME*, *MMEL1*, *ACTB*, *GAPDH*, *ACR* y *CD4*. Todos ellos fueron sintetizados y purificados por Sigma Genosys (Cambridge, Reino Unido) (Tabla 4). Tanto *ACTB* como *GAPDH* se emplearon como genes housekeeping para control interno de las reacciones de PCR entre muestras. *ACR* y *CD4* se utilizaron para verificar la presencia de ADNc espermático y para excluir la posible contaminación por leucocitos en las extracciones, respectivamente. La expresión de los genes en estudio se realizó también en testículo humano y en una mezcla de ADNc de veinte tejidos humanos, ambos obtenidos a partir de un panel comercial de ARN total humano (Clontech, Palo Alto, CA, EEUU). Esta mezcla de ADNc de tejidos se utilizó como control positivo de amplificación.

Las reacciones de PCR se realizaron en un tampón cuya composición se describe en la tabla 5. Los ciclos de amplificación y síntesis de los transcritos en estudio fueron las siguientes: 15 segundos a 94°C, 20 segundos a 60°C y 20 segundos a 72°C. Estos parámetros se llevaron a cabo durante 40 ciclos. En algunos experimentos, se reamplificó una dilución 1/50 de ADNc en las mismas condiciones de PCR y con los mismos primers. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2,5% y los tamaños de los amplicones, una vez teñidos con bromuro de etidio, se verificaron comparándolos con un marcador de ADN con diferentes fragmentos de tamaño conocido.

Tabla 4: Secuencias de los primers sentido y antisentido y tamaño esperado (en pb) de los productos de amplificación por PCR de los genes de estudio.

Gen	Secuencia de primers	Tamaño del amplión (pb)
<i>TACR1</i>	Sentido: 5'-ATGCCCAGCAGAGTCGTGT-3' Antisentido: 5'-TCGTGGTAGCGGTCAGAGG-3'	193
<i>TACR2</i>	Sentido: 5'-GCCCTACCACCTCTACTTCATCC-3' Antisentido: 5'-AGCAAACCATACCCAAACCA-3'	375
<i>TACR3</i>	Sentido: 5'-GCCAGAAGGTCCCAAACAAC-3' Antisentido: 5'-CAGCCAGCAGATAGCAAATGTC-3'	229
<i>TAC1</i>	Sentido: 5'-ACTGTCCGTCGCAAAATCC-3' Antisentido: 5'-ACTGTCCGTCGCAAAATCC-3'	212
<i>TAC3</i>	Sentido: 5'-CCAGTGTGTGAGGGGAGCA-3' Antisentido: 5'-TCCAGAGATGAGTGGCTTTTGA-3'	266
<i>TAC4</i>	Sentido: 5'-GGTCTCTTCTGTGTCTCCTGTCCTC-3' Antisentido: 5'-CATTTATTGAGTGCCTACTGTGTGCT-3'	246
α/δ TAC1	Sentido: 5'-GGAGCCCTTTGAGCATCTTC-3' Antisentido: 5'-CTTTCATAAGCCATTTGTGAGAGA-3'	168/123
β/γ TAC1	Sentido: 5'-GGAGCCCTTTGAGCATCTTC-3' Antisentido: 5'-TTCATAAGCCACAGAATTTAAAGCTC-3'	220/175
α TAC4v1	Sentido: 5'-TGTGGCCTTGGAGGAAGG-3' Antisentido: 5'-ACTGCTGCTTGACACTGAGA-3'	415
α TAC4v2	Sentido: 5'-GCCAAGGAGAAAAAAGCAT-3' Antisentido: 5'-ACTGCTGCTTGACACTGAGA-3'	292
β -TAC4	Sentido: 5'-GGAAGCGAGTGGGAGCAT-3' Antisentido: 5'-ACTGCTGCTTGACACTGAGA-3'	290
δ -TAC4	Sentido: 5'-AGTGGGAGGCAGAGAGGAT-3' Antisentido: 5'-ACTGCTGCTTGACACTGAGA-3'	223
γ -TAC4	Sentido: 5'-AAGGAGAAAAAAGGCAGAGAG-3' Antisentido: 5'-ACTGCTGCTTGACACTGAGA-3'	229

(Continuación Tabla 4)

Gen	Secuencia de primers	Tamaño del amplicón (pb)
<i>MME</i>	Sentido: 5'-AGCCTCTCGGTCCTTGTCT-3' Antisentido: 5'-GGAGCTGGTCTCGGGAATG-3'	219
<i>MMEL1</i>	Sentido: 5'-TGGACATCTTGGAGGTGGTG-3' Antisentido: 5'-GGAGTTCTGGTCGTCGTTCC-3'	164
<i>ACTB</i>	Sentido: 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3' Antisentido: 5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAG-3'	362
<i>GAPDH</i>	Sentido: 5'-CAATGCCTCCTGCACCAC-3' Antisentido: 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG-3'	350
<i>ACR</i>	Sentido: 5'-CCCTCCATTTCTGTGG-3' Antisentido: 5'-CACAGTCCAGGTCGATGAGA-3'	180
<i>CD4</i>	Sentido: 5'-AGAAAGACGCAAGCCCAGAG-3' Antisentido: 5'-GCACCAGAAGCAAGTGCCTAA-3'	127

Tabla 5: Tampón utilizado para el desarrollo de la PCR.

ADNc	3 µl
MgCl ₂	2,5 mM
Primers	0,2 µM
Mezcla de dNTPs	20 µM
Polimerasa de ADN (Immolase, Bioline, Londres, Reino Unido)	1,5 U

4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

4.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS (NK_1 , NK_2 y NK_3), DE LAS ENZIMAS DEGRADADORAS DE LAS TAQUICININAS (NEP Y NEP2) Y DEL RECEPTOR DE LA KISSPEPTINA (KISS1R)

Tras la capacitación, procedimos a la extracción de las proteínas totales de los espermatozoides mediante sonicación en 200 μ L de tampón de extracción de urea (Tabla 6). Tras la sonicación, la mezcla fue hervida 2 minutos a 100°C y posteriormente procesada empleando el kit PAGEprep Advance (Pierce, Rockford, Illinois, EEUU), con el fin de limpiar y concentrar la preparación. Este mismo protocolo se siguió para la extracción de proteínas de útero y de placenta humana. Para la extracción de proteínas de plasma seminal, centrifugamos las muestras de semen a 12000 g durante 10 minutos. Una vez recogido el sobrenadante, realizamos el mismo tipo de extracción empleando una proporción 1:1 de fluido y tampón de extracción de urea. Estas tres últimas extracciones se utilizaron como controles positivos en los diferentes experimentos llevados a cabo. Todas las muestras se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Tabla 6: Tampón de urea para la extracción de proteínas.

SDS	1%
Urea	9 M
EDTA	1 mM
Mercaptoetanol	0,7 M
Tampón Tris-HCl, pH 6,8	25 mM

En todos los casos separamos las proteínas en base a su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). La zona resolutive de los geles se preparó al 10% y la zona empaquetadora al 4%. La polimerización se hizo en presencia de TEMED y APS (Tabla 7). El tampón

empleado para la electroforesis fue Tris-Glicina. En todos los experimentos se procedió a la carga de dos marcadores de peso molecular. En uno de los pocillos se puso el marcador BioBLU Prestained Protein Ladder (gTPbio, Sevilla, España), cuyas bandas estaban teñidas con colorantes visibles que permitían seguir la evolución de la electroforesis. En el otro pocillo, se colocó el segundo marcador (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad, California, EEUU), cuyas bandas se hacen visibles, después del Western blot, en el revelado con estreptavidina (Precision Protein StrepTactin-HRP, Bio-Rad, California, España).

Tabla 7: Composición de los geles resolutivos y empaquetadores para electroforesis de proteínas.

Gel resolutivo 10%	Tampón Tris 1,5 M, pH 8,8	1,25 ml
	Acrilamida 40% 37,5:1	1,25 ml
	SDS 10%	50 µl
	H ₂ O mili-Q	2,36 ml
	APS	25 µl
	TEMED	2,5 µl
Gel empaquetador 4%	Tampón Tris 0,5 M, pH 6,8	1,25 ml
	Acrilamida 40% 37,5:1	0,5 ml
	SDS 10%	50 µl
	H ₂ O mili-Q	3,125 ml
	APS	25 µl
	TEMED	2,5 µl

Para los experimentos donde se analizaron los receptores NK₁, NK₂ y NK₃ se cargaron proteínas procedentes de espermatozoides y de útero, utilizando estas últimas como control positivo. En los casos en los que se analizó la presencia de NEP y NEP2, junto a las proteínas de origen espermático, se cargaron proteínas de plasma seminal como control positivo. En los geles donde se estudió la presencia del receptor KISS1R se procedió a la carga de las proteínas de espermatozoides, utilizando las de placenta como control positivo (Ohtaki et al., 2001). Antes de la carga de las muestras, éstas se mezclaron con tampón de carga (Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer, Pierce, Rockford, Illinois, EEUU) y se desnaturalizaron a 95°C durante 1 minuto. En todos los casos, se corrieron los geles a 200 V durante aproximadamente una hora.

Tras la separación por peso molecular de las proteínas presentes en las extracciones, procedimos a la transferencia de las mismas a una membrana de PVDF. Gracias a la carga negativa de las proteínas por la unión del SDS, pudimos transferir las proteínas del gel a la membrana al ponerlas bajo un campo eléctrico perpendicular a la misma. Previa a la transferencia, la membrana fue equilibrada en metanol. La transferencia se llevó a cabo en un tampón de Tris-Glicina con SDS al 0,02% a 70 V durante 3 horas. Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF, se bloquearon, durante al menos dos horas, con el agente bloqueante del kit de detección ECL Advance Western Blotting (Amersham, Buckinghamshire, UK) disuelto en TTBS con 0,5% del detergente Tween-20 a pH 7,5, con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la propia membrana. La incubación con los diferentes anticuerpos primarios específicos se realizó en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, tras varios lavados en TTBS, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios específicos conjugados con la enzima peroxidasa de rábano, que reconocen a los anticuerpos primarios. Además, se añadió estreptavidina conjugada a peroxidasa en una dilución 1:20000 para que se uniera al marcador Precision Plus Protein Standards, permitiendo su visualización tras el revelado. Los anticuerpos primarios, los anticuerpos secundarios y las diluciones empleadas para cada proteína en estudio se adjuntan en la Tabla 8. El revelado se hizo con las soluciones del kit de detección ECL Advance Western Blotting (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), empleando una técnica basada en la amplificación de la quimioluminiscencia gracias a la reacción catalizada por la peroxidasa sobre el peróxido de hidrógeno. El revelado se llevó a cabo en películas autorradiográficas.

Tabla 8: Anticuerpos primarios y secundarios y diluciones utilizadas en los experimentos de Western blot.

	Antígeno a reconocer	Hospedador	Dilución	Referencia y casa comercial
Anticuerpos primarios	NK ₁	Conejo	1:10000	T-5950, Sigma Aldrich
	NK ₂	Conejo	1:10000	T-6075, Sigma Aldrich
	NK ₃	Conejo	1:10000	T-5825, Sigma Aldrich
	NEP	Conejo	1:10000	sc-9149, Santa Cruz Biotechnology
	NEP2	Conejo	1:10000	HPA 007876, Sigma Aldrich
	NEP2	Cabra	1:10000	sc-104450, Santa Cruz Biotechnology
	KISS1R	Cabra	1:10000	sc-48220, Santa Cruz Biotechnology
Anticuerpos secundarios	Anti-conejo IgG: HRP	Cabra	1:100000	sc-2054, Santa Cruz Biotechnology
	Anti-cabra IgG: HRP	Burro	1:100000	sc-2056, Santa Cruz Biotechnology

4.2. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS EN RESIDUOS DE TIROSINA O EN RESIDUOS DE SERINA/TREONINA VÍA PKA O PKC

Para estos análisis por Western blot, la extracción de proteínas se realizó mediante ebullición durante 5 minutos en tampón de Laemmli (Laemmli, 1970) suplementado con 2% de mercaptoetanol. Las proteínas se separaron mediante electroforesis, empleando condiciones de carga, carrera y transferencia similares a las descritas anteriormente. La inmunodetección se llevó a cabo con los

anticuerpos enumerados en la Tabla 9, empleando el anticuerpo anti-actina como control interno para la cuantificación de la cantidad de proteína.

Tabla 9: Anticuerpos primarios y secundarios y diluciones utilizadas en los experimentos de análisis de fosforilaciones por Western blot.

	Antígeno a reconocer	Hospedador	Dilución	Referencia y casa comercial
Anticuerpos primarios	P-Tyr	Ratón	1:5000	sc-508, Santa Cruz Biotechnology
	P-Ser/Thr vía PKA	Conejo	1:5000	9624, Cell Signaling Technology
	P-Ser/Thr vía PKC	Conejo	1:10000	6967, Cell Signaling Technology
	Actina	Conejo	1:5000	sc-1616, Santa Cruz Biotechnology
Anticuerpos secundarios	Anti-ratón IgG: HRP	Caballo	1:20000	7076, Cell Signaling Technology
	Anti-conejo IgG: HRP	Cabra	1:50000	sc-2054, Santa Cruz Biotechnology

En las mismas experiencias se analizaron la actina y las fosforilaciones de residuos de tirosina o de serina/treonina tras activación de las vías de la PKA o de la PKC mediante eliminación sucesiva de los anticuerpos unidos a la membrana de PVDF en una solución de NaOH 0,2 N.

Una vez reveladas las membranas en películas autorradiográficas, se estudió la densitometría de las señales mediante el programa de análisis de imagen Image Lab (Bio-Rad). La actina se utilizó, en todos los casos, para normalizar la cantidad de proteína extraída en cada condición.

5. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La inmunolocalización de las distintas proteínas en estudio en los espermatozoides se llevó a cabo utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Los espermatozoides se lavaron y resuspendieron en PBS realizando posteriormente su extensión sobre portaobjetos pretratados con poli-L-lisina. Una vez secadas, las células se fijaron durante 20 minutos con metanol frío a -20°C , salvo en los ensayos donde se empleó el anticuerpo primario contra HK-1, en los que los espermatozoides fueron fijados con PFA al 4% en PBS durante 10 minutos. Tras este paso, los espermatozoides se permeabilizaron con el detergente Tritón X-100 al 5% en PBS. Posteriormente, los portaobjetos se bloquearon con caseína al 2% en PBS durante 2 horas, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios, y se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios policlonales específicos para NK₁, NK₂, NK₃, SP, NKA, NKB, HK-1, NEP, NEP2, KISS y KISS1R a las diluciones indicadas en la Tabla 10. A la mañana siguiente y tras varios lavados con PBS, las muestras se incubaron durante 60 minutos con un anticuerpo secundario conjugado con FITC (Tabla 10). Los portaobjetos finalmente se montaron utilizando el medio de montaje Prolong Gold (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EEUU) con o sin DAPI (que se une específicamente al núcleo) y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX-51.

En los experimentos de doble inmunotinción en los que estudiamos la presencia simultánea de dos proteínas en los mismos espermatozoides (KISS-KISS1R y KISS-NKB), el protocolo fue similar al descrito anteriormente, pero la incubación se realizó con dos anticuerpos primarios a la vez, teniendo en cuenta que cada uno de ellos debe estar hecho en un hospedador diferente para evitar que se produzcan reconocimientos cruzados al añadir posteriormente los anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos distintos (Texas-Red o FITC). La incubación con los anticuerpos secundarios también se realizó en conjunto.

En todas las experiencias se realizaron controles negativos, empleando las mismas condiciones experimentales anteriormente descritas, pero sin la adición del anticuerpo primario, o bien mediante pre-absorción con el péptido de

inmunización correspondiente (5 µg/ml), en los casos en los que éste se encontraba disponible (SP, HK-1 y KISS).

Tabla 10: Anticuerpos primarios y secundarios y diluciones utilizadas en los experimentos de inmunofluorescencia indirecta.

	Antígeno a reconocer	Hospedador	Dilución	Referencia y casa comercial
Anticuerpos primarios	NK ₁	Conejo	1:100	T-5950, Sigma Aldrich
	NK ₂	Conejo	1:100	T-6075, Sigma Aldrich
	NK ₃	Conejo	1:100	T-5825, Sigma Aldrich
	SP	Cabra	1:200	sc-9758, Santa Cruz Biotechnology
	NKA	Conejo	1:400	T-4446, Peninsula Laboratories Inc.
	NKB	Cabra	1:200	sc-14109, Santa Cruz Biotechnology
	HK-1	Cabra	1:200	sc-47440, Santa Cruz Biotechnology
	NEP	Conejo	1:200	sc-9149, Santa Cruz Biotechnology
	NEP2	Cabra	1:100	sc-104450, Santa Cruz Biotechnology
		Conejo	1:400	HPA007876, Sigma Aldrich
	KISS	Conejo	1:400	sc-15400, Santa Cruz Biotechnology
		Conejo	1:200	T-4771, Bachem
	KISS1R	Cabra	1:600	sc-48220, Santa Cruz Biotechnology

(Continuación Tabla 10)

	Antígeno a reconocer	Hospedador	Dilución	Referencia y casa comercial
Anticuerpos secundarios	Anti-conejo IgG: FITC	Gallina	1:400	sc-2990, Santa Cruz Biotechnology
	Anti-cabra IgG: FITC	Burro	1:400	sc-2024, Santa Cruz Biotechnology
	Anti-cabra IgG: TexasRed	Burro	1:400	sc-2783, Santa Cruz Biotechnology

6. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizaron estudios de inmunohistoquímica en testículo humano para definir la localización de la SP, HK-1 y KISS en dicho tejido. Para ello, se adquirieron cortes de testículo humano congelados de entre 7 y 10 μm de espesor (Zyagen, San Diego, California, EEUU). Para una correcta tinción del tejido, se siguieron las instrucciones del kit de detección de inmunohistoquímica EXPOSE HRP/DAB (ab-80436, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Este kit es específico para detectar anticuerpos obtenidos en conejo o ratón. Una vez descongelados los cortes de testículo, se añadieron unas gotas de bloqueante de peróxido de hidrógeno dejándolo actuar durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron dos veces en tampón de lavado y se incubaron durante 10 minutos con solución bloqueante de proteínas para eliminar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios. Éstos se añadieron a las concentraciones expuestas en la Tabla 11, dejándolos actuar durante toda la noche. Tras varios lavados, los tejidos se incubaron con un conjugado de peroxidasa durante 10 minutos. Finalmente, se añadió una solución con cromógeno de DAB y sustrato del mismo, dejándola actuar durante 10 minutos. Una vez lavados y contrateñidos con una tinción de hematoxilina-eosina, los cortes se evaluaron en campo claro utilizando un microscopio Olympus BX-51 a 10X y 20X.

Tabla 11: Anticuerpos primarios y diluciones utilizadas en los experimentos de inmunohistoquímica.

Antígeno a reconocer	Hospedador	Dilución	Referencia y casa comercial
SP	Conejo	1:100	8450-0004, Biorad ABD Serotec
HK-1	Conejo	1:100	ab-174318, Abcam
KISS	Conejo	1:100	T-4771, Bachem

7. ESTUDIOS DE MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA

Los análisis de movilidad fueron realizados manualmente, con la ayuda de un contador celular, o utilizando un sistema de análisis de movilidad computerizado SCA® (Microptic, Barcelona, España), configurado con los parámetros de la Tabla 12 y asociado a un microscopio de contraste de fase. La concentración y la movilidad espermática se determinaron añadiendo alícuotas de 5 μl de las diferentes muestras en una cámara de recuento tipo Makler, precalentada a 37°C. Se contaron un mínimo de 200 espermatozoides por cada gota analizada.

Tabla 12: Configuración de los valores de análisis usados en el sistema SCA®.

Area de partículas analizadas		2-60 μm
LVV	Velocidad mínima y máxima para que un espermatozoide sea considerado lento. Espermatozoides con valores inferiores al LVV mínimo serán considerados inmóviles.	10>15 $\mu\text{m/s}$
MVV	Velocidad mínima y máxima para que un espermatozoide sea considerado medio. Espermatozoides con velocidades superiores al MVV máximo serán considerados rápidos.	15>35 $\mu\text{m/s}$
Mínimo STR	Valor de STR a partir del cual un espermatozoide es considerado progresivo	80%

La valoración de la movilidad de los espermatozoides se realizó según las recomendaciones de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 1999), clasificando los espermatozoides en base a su velocidad (Tabla 13).

Tabla 13: Clasificación de los espermatozoides por el tipo de movilidad según la OMS (Organización Mundial de la Salud, 1999).

Clasificación de espermatozoides	Velocidad
Movilidad tipo a. Espermatozoides rápidos progresivos	>25 $\mu\text{m/s}$
Movilidad tipo b. Espermatozoides lentos y progresivos	10-25 $\mu\text{m/s}$
Movilidad tipo c. Espermatozoides no progresivos	<10 $\mu\text{m/s}$
Movilidad tipo d. Espermatozoides inmóviles	

7.1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS TAQUICININAS SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS. ANÁLISIS DE LA HIPERACTIVACIÓN

Para investigar los efectos de las TKs, realizamos cuatro tipos de experimentos.

En tres de ellos, la movilidad fue testada manualmente siguiendo las directrices de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 1999). La movilidad de cada espermatozoide se catalogó como *a* (movilidad progresiva rápida), *b* (movilidad progresiva lenta), *c* (movilidad no progresiva) o *d* (inmovilidad). Posteriormente, la movilidad progresiva (*a* + *b*), la movilidad no progresiva (*c*) y la inmovilidad (*d*) se porcentuaron respecto al total (*a* + *b* + *c* + *d*), considerado como 100%. Además, las muestras de semen se dividieron en tres subpoblaciones según su movilidad inicial: muestras A, con valores entre 60-70% de movilidad progresiva; muestras B, con valores entre 45-60% de movilidad progresiva; y muestras C, con valores entre 30-45% de movilidad progresiva. Se realizaron los siguientes tipos de experimentos.

1. Las muestras de semen se dividieron en varias alícuotas y cada alícuota fue tratada con un péptido (SP, NKA, NKB, hHK-1 o [MePhe⁷]-NKB), a concentraciones finales entre 0,01 nM y 10 μM , o su correspondiente solvente. La movilidad de la muestra se midió 5 minutos antes de la adición de las TKs y tras 1 y 15

- minutos de contacto con el correspondiente péptido o su solvente.
2. En otros experimentos, las muestras se trataron con SP (1 μ M), hHK-1 (1 μ M), NKA (1 μ M), NKB (1 μ M) o sus respectivos solventes y la movilidad se midió 5 minutos antes de su adición y a los 1, 15, 30, 45, 60, 120 y 240 minutos de contacto con el producto.
 3. Los últimos experimentos se llevaron a cabo en alícuotas pretratadas durante 45 minutos con el antagonista selectivo del receptor NK₁ SR140333 (10 nM), el antagonista selectivo del receptor NK₂ SR48968 (10 nM), el antagonista selectivo del receptor NK₃ SR142801 (10 nM) o su solvente antes de la adición de las TKs o sus solventes. La movilidad se midió a los 15 minutos de la adición de la TK en estudio.

Se elaboraron curvas logarítmicas dosis-respuesta para SP, NKA, NKB, hHK-1 y [MePhe⁷]-NKB en presencia o ausencia de alguno de los antagonistas o su solvente con los datos obtenidos a los 15 minutos de exposición al agonista. Por otro lado, se calcularon los valores de cambio de movilidad (incremento o descenso) expresando el porcentaje de móviles progresivos, móviles no progresivos o inmóviles del siguiente modo: (valor tras x minutos de incubación con el péptido o su solvente) – (valor inicial medido 5 minutos antes de la adición del péptido o su solvente). Estos valores se representaron como incremento o descenso respecto al valor inicial o bien como porcentaje respecto a la respuesta máxima (E_{max}), considerando ésta como 100%.

Por último, se llevó a cabo un experimento en el que el análisis de la movilidad espermática al añadir SP (1 μ M) o su solvente se realizó mediante CASA. Estudiamos al menos 200 espermatozoides en cinco campos distintos y, para cada campo, se obtuvieron veinticinco imágenes digitalizadas consecutivas tomadas en un segundo. De este modo, pudimos analizar los cambios que inducía esta TK en los parámetros cinéticos de movilidad, que se han recogido en la Tabla 14. En base a estos parámetros, el sistema de medida CASA permite el estudio de la movilidad hiperactiva en los espermatozoides. Un espermatozoide es catalogado como hiperactivo cuando presenta una VCL > 150 μ M/s, una LIN < 50% y una ALH > 7 μ m. En nuestros experimentos, realizamos medidas a los 2,

15, 30 60, 120, 180 y 240 minutos. Los valores de cambio para cada tiempo se calcularon del siguiente modo: $(\text{valor a tiempo x de adición de SP}) - (\text{valor a tiempo x de adición de solvente}) / (\text{valor a tiempo x de adición de solvente}) \times 100$.

Tabla 14: Parámetros cinéticos de la movilidad espermática determinados por el sistema CASA.

Parámetro	Descripción	Unidad
VCL	Velocidad curvilínea. Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.	$\mu\text{m/s}$
VSL	Velocidad rectilínea. Distancia recorrida por el espermatozoide desde el primer punto hasta el último de su trayectoria en función del tiempo.	$\mu\text{m/s}$
VAP	Velocidad promedio. Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media en función del tiempo.	$\mu\text{m/s}$
LIN	Índice de linealidad. Linealidad de la trayectoria curvilínea. Calculada como $(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$.	%
STR	Índice de rectitud. Rectitud de la trayectoria. Calculada como $(\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$.	%
WOB	Índice de oscilación. Oscilación de la trayectoria real con respecto a la trayectoria promedio. Calculada como $(\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100$.	%
ALH	Amplitud promedio del desplazamiento lateral de la cabeza. Es la magnitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide con respecto a su trayectoria promedio.	μm
BCF	Frecuencia de batido flagelar. Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa a la trayectoria lineal en función del tiempo.	Hz

7.2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS ENZIMAS NEP Y NEP2 SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS

En estas experiencias realizamos un análisis tanto manual como computerizado de la movilidad. Se llevaron a cabo dos tipos de experimentos:

1. Las muestras de semen se dividieron en varias alícuotas y se trataron con una concentración única de fosforamidón (1 nM – 1 μ M), un inhibidor de las enzimas degradadoras de TKs, NEP y NEP2, o un volumen equivalente de su solvente. Como se describe anteriormente, la movilidad de la muestra se midió 5 minutos antes de la adición del producto o su solvente y en los minutos 1, 15, 60, 120 y 240 tras la misma.
2. Se analizó el efecto del fosforamidón (1 μ M) o su solvente en alícuotas pretratadas durante 45 minutos con el antagonista selectivo del receptor NK₁ SR140333 (10 nM), el antagonista selectivo del receptor NK₂ SR48968 (10 nM), el antagonista selectivo del receptor NK₃ SR142801 (10 nM), un cocktail de los tres antagonistas (10 nM de cada uno) o sus respectivos solventes. La movilidad se midió a los 60 minutos de la adición del fosforamidón.

En todos los casos, los valores de movilidad progresiva, de movilidad no progresiva o de inmovilidad se expresaron como incrementos positivos o negativos calculados como: (valor a tiempo x de adición de fosforamidón) – (valor a tiempo x de adición de solvente).

7.3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA KISSPEPTINA SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE UN ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE LA KISSPEPTINA. ANÁLISIS DE LA HIPERACTIVACIÓN

Todos los experimentos de este apartado se realizaron con la ayuda del sistema CASA en las mismas condiciones descritas anteriormente. Nuevamente, llevamos a cabo dos tipos de experimentos:

1. Las muestras de espermatozoides se dividieron en varias alícuotas y cada una de ellas fue tratada con una concentración única de kisspeptina (kisspeptina-13, Bachem) (10 nM – 10 μ M) o su correspondiente solvente. La movilidad espermática se midió 5 minutos antes de la adición de la kisspeptina y a los 2, 15, 30, 60 y 120 minutos tras la misma.
2. También se analizó el efecto de la kisspeptina (10 μ M) o su solvente en alícuotas pretratadas durante 15 minutos con un antagonista selectivo de KISS1R, el péptido 234 (p234, 0,3 μ M) (Roseweir et al., 2009), o su solvente. El estudio de la movilidad se realizó a los mismos tiempos tras la adición de kisspeptina que en el caso anterior.

Los valores de movilidad progresiva, movilidad no progresiva o inmovilidad se expresaron como incrementos positivos o negativos producidos por la kisspeptina respecto a los valores observados al mismo tiempo en las alícuotas tratadas con su solvente. Para ello se empleó la siguiente fórmula de normalización: (valor a tiempo x de adición de kisspeptina – valor inicial de esa alícuota) – (valor a tiempo x de adición de solvente – valor inicial de esa alícuota).

Al igual que en los casos anteriores, se analizaron los parámetros cinéticos descritos en la Tabla 14, y la hiperactivación en los espermatozoides tratados con kisspeptina 10 μ M en presencia o ausencia de p234. Los cambios de los diferentes parámetros de movilidad para cada tiempo se calcularon del siguiente modo: (valor a tiempo x de adición de kisspeptina) – (valor a tiempo x de adición de solvente)/(valor a tiempo x de adición de solvente) x 100.

8. ESTUDIOS DE LOS EFECTOS DE LAS TAQUICININAS SOBRE LA VITALIDAD ESPERMÁTICA

Para determinar si la adición de TKs a los espermatozoides humanos producía algún efecto nocivo sobre los mismos, diseñamos varios experimentos. Uno de ellos fue el análisis de la vitalidad de los espermatozoides tras la adición de SP ($1\text{ }\mu\text{M}$) o su solvente a los 2, 60, 120 y 240 minutos y a las 24 horas. Para dicho estudio utilizamos, simultáneamente y en las mismas alícuotas, dos técnicas clásicas descritas por la OMS para el estudio de la vitalidad en espermatozoides (Organización Mundial de la Salud, 1999). En ambos casos, para cada tiempo estudiado, se extrajo una alícuota de la muestra tratada con SP y otra de la muestra tratada con su solvente. Las dos técnicas empleadas fueron:

1. Análisis de vitalidad mediante la tinción de eosina-nigrosina. Se basa en que las células muertas, cuya membrana plasmática está dañada, permiten el paso de ciertos colorantes, mientras que los vivos mantienen su membrana intacta y el colorante no puede atravesarla. Con este test, los espermatozoides muertos aparecen con el núcleo teñido de rojo/rosa, mientras que los vivos se mantienen blancos sin teñir. Esto hace que los espermatozoides muertos o con la permeabilidad de la membrana alterada muestren sus cabezas teñidas de rojo, quedando sin teñir los espermatozoides vivos. Para una mejor visualización y conteo de las células de cada tipo al microscopio óptico, se realiza una contratinción con nigrosina. El procedimiento llevado a cabo consistió en añadir dos volúmenes de eosina ($0,01\text{ g/mL}$) al volumen de muestra a analizar, seguido de la adición de tres volúmenes de nigrosina ($0,1\text{ g/mL}$). Se homogeniza la suspensión y se realiza una extensión para su conteo en un microscopio óptico utilizando un objetivo de inmersión en aceite 100X.
2. Análisis de la vitalidad mediante el test hipoosmótico. Esta técnica se basa en la capacidad de reacción que tienen los

espermatozoides vivos al ser resuspendidos en un medio con baja osmolaridad. La reacción consiste en el enrollamiento del flagelo, hecho que no ocurre en los espermatozoides que ya estaban muertos antes de la exposición a dicho medio. Las alícuotas extraídas para este análisis se centrifugan a 400 g para eliminar el medio de cultivo y se resuspenden en un medio compuesto por 0,74% de citrato sódico y 1,35% de fructosa disueltos en agua. Tras 10 minutos de incubación en este medio, se centrifugan de nuevo en las mismas condiciones, con el fin de concentrar los espermatozoides y visualizarlos al microscopio óptico utilizando un objetivo 10X. A continuación se procede a contar el porcentaje de espermatozoides con el flagelo enrollado respecto al total para establecer el porcentaje de espermatozoides vivos en cada tiempo de estudio.

En ambos protocolos se calcularon los cambios producidos por la SP (1 μ M) frente al solvente del siguiente modo: (porcentaje de espermatozoides vivos a tiempo x tras la adición de SP) – (porcentaje de espermatozoides vivos a tiempo x tras la adición de solvente).

9. CITOMETRÍA DE FLUJO

En estos experimentos utilizamos dos citómetros de flujo: un Beckman Coulter (Life Sciences, Indianapolis, IN) y un BD Accuri C6 (BD Biosciences, San José, CA) para llevar a cabo estudios de fragmentación de ADN, de apoptosis, de estrés oxidativo y de capacitación espermática.

9.1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS TAQUICININAS SOBRE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

El ADN de los espermatozoides puede sufrir roturas monocatenarias o bicatenarias que pueden ser identificadas por la unión de nucleótidos modificados al extremo 3'-OH libre de estas roturas mediante la acción de la enzima TdT en lo que se conoce como reacción TUNEL. En nuestro caso, estudiamos si la adición de SP (1 μ M) a una suspensión espermática era capaz de inducir un aumento de los niveles de fragmentación de ADN. Para ello, extrajimos alícuotas de una suspensión de espermatozoides que había sido tratada con dicha concentración de SP o su solvente y analizamos los efectos tras diversos tiempos de exposición (2, 60, 120, 240 minutos y 24 horas). Todas las muestras se sometieron al protocolo descrito en el kit *In Situ* Cell Death Detection, Fluorescein (Roche, Mannheim, Alemania) para células en suspensión. La lectura de los niveles de fragmentación de ADN se realizó excitando el FITC de los dUTP incorporados a 488 nm y detectando la emisión entre 515 y 565 nm. En cada ensayo se realizó un control negativo de reacción para establecer la autofluorescencia de la muestra. Estas medidas se realizaron en el citómetro Beckman Coulter.

9.2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS TAQUICININAS SOBRE LOS PROCESOS DE APOPTOSIS ESPERMÁTICA

Continuando nuestros estudios sobre los posibles efectos nocivos de las TKs, investigamos su capacidad de inducir muerte celular por apoptosis en los espermatozoides. Uno de los procesos moleculares que se producen en las células eucariotas durante la apoptosis o muerte celular programada es la

redistribución del fosfolípido fosfatidilserina a la cara externa desde su localización habitual en la cara interna de la bicapa lipídica que conforma la membrana plasmática (Koopman et al., 1994; Martín et al., 1995). La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos que tiene una gran afinidad por la fosfatidilserina en presencia de Ca^{2+} . Basándonos en este hecho, decidimos estudiar si la adición de SP (1 μM) a los espermatozoides humanos producía cambios en los niveles de apoptosis, en comparación con los efectos de su solvente. En este experimento, se trataron las suspensiones de espermatozoides con SP o su solvente y se extrajeron alícuotas a los 2, 60, 120, 240 minutos y 24 horas. Se procedió al marcaje con anexina V marcada con FITC (Miltenyi Biotec, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de los niveles de apoptosis se realizó excitando la FITC incorporada a la anexina V a 488 nm y detectando la emisión entre 515 y 565 nm. En cada ensayo se realizó un control negativo de reacción para establecer la autofluorescencia de la muestra. Estas medidas se realizaron en el citómetro Beckman Coulter.

9.3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS TAQUICININAS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO ESPERMÁTICO

Las especies reactivas del oxígeno son las responsables de la generación de estrés oxidativo en los distintos tipos celulares produciendo peroxidación lipídica y daños en el ADN. Para estudiar el posible estrés oxidativo inducido por la SP (1 μM) en espermatozoides usamos la sonda DHE (Sigma) (De Iuliis et al., 2006; Aitken et al., 2006). El DHE es una molécula de escasa fluorescencia que, sin embargo, cuando se oxida en el interior celular por el anión superóxido (O_2^-) crea fluorocromos capaces de unirse al ADN como el etidio y el 2-hidroxi-etidio, dando lugar a la aparición de una fluorescencia nuclear roja tras excitación a 510 nm. Este hecho hace al DHE un indicador muy sensible de la producción de especies reactivas del oxígeno en el interior de los espermatozoides. Por ello comparamos muestras de espermatozoides tratadas con SP (1 μM) o con su solvente a los 2, 60, 120, 240 minutos y 24 horas de incubación para analizar si había un aumento de producción de anión superóxido inducida por la SP. Las alícuotas extraídas a cada uno de los tiempos de estudio se incubaron durante 15 minutos en la oscuridad con DHE (2 μM). A continuación se lavaron en PBS y se analizaron en el citómetro Beckman Coulter utilizando una longitud de onda de

excitación de 535 nm. La emisión de fluorescencia fue medida a 610 nm. En todos los ensayos se realizó un control negativo para medir los niveles de autofluorescencia de la muestra.

9.4. ESTUDIO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Los efectos de la SP (1 μM o 100 nM) o la kisspeptina (10 μM) sobre los niveles de capacitación de las muestras espermáticas se analizaron por citometría de flujo mediante la medida de los niveles de fosforilación de residuos de tirosina. Para ello utilizamos un anticuerpo monoclonal específico contra PY marcado con FITC (PY20 FITC, sc-508 FITC, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Como en experimentos anteriores, las muestras se capacitaron en el incubador a 37°C y 5% CO₂. Realizamos cuatro tipos de experimentos diferentes:

1. Ensayos en espermatozoides recién capacitados mediante gradiente de densidad seguido de swim-up. Las suspensiones se introdujeron en el incubador de CO₂ y se extrajeron alícuotas a los 15, 60, 120 y 180 minutos para su marcaje con PY20 FITC. Estos experimentos se realizaron para analizar el grado de capacitación de los espermatozoides y ver si los cambios que se producían en los niveles de fosforilación de tirosina permitían cuantificar esta capacitación por citometría de flujo.
2. Ensayos en suspensiones de espermatozoides divididas en dos alícuotas, una de ellas tratada con SP (1 μM o 100 nM) y la otra tratada con el volumen correspondiente de solvente en el momento previo a su introducción en el incubador bajo condiciones capacitantes. Se extrajeron alícuotas a los 15, 60, 120 y 180 minutos de cada tratamiento para su marcaje con PY20 FITC.
3. Otra serie de experimentos se realizó en muestras pretratadas durante 45 minutos con un cocktail de antagonistas de los receptores taquicinérgicos (el antagonista selectivo del receptor NK₁ SR140333 (100 nM), el antagonista selectivo del receptor NK₂ SR48968 (100 nM) y el antagonista selectivo del receptor NK₃ SB222200 (1 μM) o sus solventes antes de la adición de SP (1 μM) o su solvente. En estos casos, las muestras fueron

introducidas en el incubador tras los 45 minutos de pretratamiento y justo antes de la adición de la SP. Se volvieron a extraer alícuotas para su estudio por citometría de flujo tras marcaje con PY20 FITC a los 15, 60, 120 y 180 minutos.

4. En un último grupo de experimentos se añadió kisspeptina (10 μ M) o su solvente a las muestras justo antes de su introducción bajo condiciones capacitantes. Del mismo modo que en los ensayos anteriores, se extrajeron alícuotas a los 15, 60, 120 y 180 minutos para su estudio por citometría de flujo tras el marcaje con el anticuerpo PY20 FITC.

En todos los casos, las alícuotas extraídas a cada tiempo se fijaron con PFA al 4% en PBS durante al menos 10 minutos. Tras centrifugar y lavar con PBS, los espermatozoides fijados se permeabilizaron con Triton X-100 0,5% en PBS durante 30 minutos en agitación. Las células se lavaron varias veces con PBS, se resuspendieron en una solución que contenía el anticuerpo PY20 FITC a una dilución 1:100 en PBS y se incubaron durante al menos 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras este tiempo, se lavaron las muestras con PBS y se analizaron en un citómetro BD Accuri C6. Las muestras se excitaron a 488 nm y la señal de emisión se recogió a 535 nm. Para todas las muestras usadas en estos experimentos se realizó un control negativo omitiendo el anticuerpo con el fin de determinar la autofluorescencia de cada muestra.

10. MEDIDAS DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Y Na^+ , $[\text{Na}^+]_i$, EN EL ESPERMATOZOIDE

10.1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS TAQUICININAS Y LA KISSPEPTINA SOBRE LOS NIVELES DE $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Para analizar los efectos de la SP (1 μM) o la kisspeptina (10 μM) sobre la movilización de Ca^{2+} libre en el citoplasma celular, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, los espermatozoides se capacitaron y se incubaron a continuación con la forma acetoximetilester de la sonda radiométrica Fura-2 (Fura-2/AM, 8 μM , Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, EEUU) durante 60 minutos a temperatura ambiente y en presencia del detergente no citotóxico ácido plurónico al 0,1% (Molecular Probes). A continuación, los espermatozoides se lavaron y resuspendieron en mHTF o en un medio con la siguiente composición: NaCl 140 mM; KCl 4,7 mM; CaCl_2 2,0 mM; MgCl_2 0,3 mM; glucosa 10 mM y HEPES 10 mM, pH 7,4. Las suspensiones en estudio se ajustaron a una concentración de 10 millones de espermatozoides por mililitro y se añadieron alícuotas de 1 ml a una cubeta de cuarzo en el espectrofluorímetro (SLM Aminco-Bowman, Series 2; Microbeam, Barcelona, España) manteniendo una agitación magnética constante a 37°C. La suspensión de espermatozoides marcada con la sonda específica de Ca^{2+} Fura-2 se iluminó alternativamente a dos longitudes de onda de excitación (340 nm y 380 nm). La longitud de onda de emisión de la sonda es 510 nm. Los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se monitorizaron usando la ratio de fluorescencia F340/F380. Al final de todos los experimentos se añadió progesterona (1 μM) como control interno. La calibración de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se llevó a cabo siguiendo la ecuación de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985), añadiendo Tritón X-100 (5%) para obtener la respuesta máxima y EGTA (40 mM) para obtener la respuesta mínima de cada ensayo.

Por otro lado, monitorizamos la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides aislados. Para ello, los espermatozoides se incubaron con la forma acetoximetilester de otra sonda específica de Ca^{2+} , el Oregon Green (Oregon Green 488 BAPTA-2, 10 μM , Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, EEUU) durante 60 minutos a temperatura ambiente en presencia del detergente no citotóxico ácido plurónico

al 0,1% (Molecular Probes). A continuación, los espermatozoides se lavaron, se resuspendieron en mHTF y se inmovilizaron en cámaras de Neubauer para su observación en el microscopio de fluorescencia Olympus BX-51, excitando a 488 nm (longitud de onda de excitación de la sonda). Inmediatamente se introdujeron en la cámara 100 μ l de una solución con SP 1 μ M o progesterona 1 μ M y se tomaron imágenes sucesivas de espermatozoides inmovilizados para visualizar el cambio en la $[Ca^{2+}]_i$.

10.2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS TAQUICININAS Y LA KISSPETINA SOBRE LOS NIVELES DE $[Na^+]_i$

Para analizar el posible efecto de la SP (1 μ M) y de la kisspeptina (10 μ M) sobre la concentración de Na^+ libre en el citoplasma celular, $[Na^+]_i$, los espermatozoides se capacitaron, se ajustaron a una concentración de 35 millones por mililitro y se incubaron en mHTF con la forma acetoximetilester de la sonda SBFI (SBFI/AM, 10 μ M; Invitrogen) durante 360 minutos a temperatura ambiente en presencia de ácido plurónico (0,1%). Tras esta incubación, los espermatozoides se resuspendieron nuevamente en mHTF. Las alícuotas de 1 ml a ensayar se dispusieron en una cubeta de cuarzo de espectrofluorimetría, como se describió anteriormente para las muestras marcadas con Fura-2. En estos casos, la suspensión espermática se excitó alternativamente con dos longitudes de onda (340 nm y 385 nm) y la fluorescencia emitida fue recogida a 495 nm. Los cambios en la $[Na^+]_i$ se expresaron en función de la ratio de fluorescencia F340/F385, específico para la sonda SBFI. Como control interno se añadió al final de cada experimento EGTA (4 mM).

11. ESTUDIOS DE QUIMIOTAXIS

Basándonos en la quimiotaxis que experimentan los espermatozoides hacia el FF y en experiencias previas descritas en la bibliografía (Ralt et al., 1994; Cohen-Dayag et al., 1995; Eisenbach y Tur-Kaspa, 1999; Eisenbach y Giojalas, 2006; Kaupp et al., 2008; Teves et al., 2009), diseñamos un sistema que nos permitiera estudiar y cuantificar este hecho (Figura 13). Para ello utilizamos una placa Petri de 100 mm de diámetro y rayamos su superficie con un lápiz de diamante, con el fin de establecer los límites de cada una de las partes del diseño. Rodeándolo se colocaron papeles de filtro empapados en PBS para aumentar la humedad cercana a las gotas y minimizar su posible evaporación. Del mismo modo, el sistema se colocó sobre un soporte nivelado para asegurarnos que estaba en perfecto equilibrio y que el efecto quimiotáctico no se veía interferido por efecto de la fuerza de la gravedad. Para llevar a cabo los experimentos, se disponían 100 μL de una suspensión de espermatozoides pretratados durante 45 minutos con un cocktail de antagonistas de los receptores taquicinérgicos (el antagonista selectivo del receptor NK_1 SR140333 (100 nM), el antagonista selectivo del receptor NK_2 SR48968 (100 nM), el antagonista selectivo del receptor NK_3 SB222200 (1 μM)) o sus solventes, a una concentración de 20 millones por mililitro, en el centro de la cámara. A 1,5 cm de distancia de los espermatozoides se disponían 85 μL de FF a un lado y 85 μL de medio mHTF al otro. En los brazos que conectaban las 3 gotas se colocaron 15 μL de FF en un lado y 15 μL de mHTF en el otro, sin llegar a unirse con ninguna de las gotas mayores. La unión entre gotas se producía en el orden indicado en la figura 13 con ayuda de una punta de pipeta que era reemplazada tras cada acción para evitar el arrastre de los diferentes medios y/o espermatozoides entre las distintas partes del sistema.

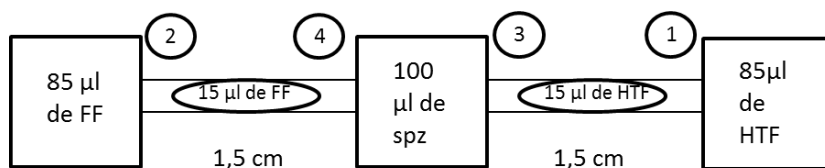


Figura 13: Cámara para realizar experimentos de quimiotaxis. El orden de unión de las gotas entre sí se representa en los círculos.

Tras la unión de todas las gotas, se extraían 5 µl de las gotas de los extremos a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos y se contaba, con ayuda de un microscopio óptico el número de espermatozoides en cuatro campos distintos. Este procedimiento se realizaba dos veces y se obtenía la media de los datos obtenidos en cada gota analizada. La normalización de los datos se realizó del siguiente modo: $(\text{número de espermatozoides encontrados en la gota de FF} - \text{número de espermatozoides encontrados en la gota de mHTF}) / (\text{número de espermatozoides encontrados en la gota de mHTF}) * 100$. Esta normalización se realizó tanto en los experimentos donde los espermatozoides fueron tratados con los antagonistas de los receptores de la TKs como en aquellos donde se incubaron solo con sus solventes.

12. ESTUDIOS DE REACCIÓN ACROSÓMICA

El estado acrosómico de los espermatozoides fue analizado mediante la técnica de unión al acrosoma del FITC-PSA (Mendoza et al., 1992; Bedu-Addo et al., 2005). Tras el swim-up, la concentración de las muestras se ajustó a 10 millones de espermatozoides por mililitro y se dispusieron bajo condiciones capacitantes a 37°C y 5% CO₂ durante 6 horas. Tras este tiempo, se añadieron los productos en estudio o sus diferentes solventes, realizándose diversos experimentos:

1. Algunas muestras se dividieron en cuatro alícuotas que se trataron con SP (1 µM), el ionóforo A23187 (10 µM) o sus respectivos solventes, y dejando actuar los distintos compuestos durante 60 minutos más en las mismas condiciones. El ionóforo se emplea para conocer el grado máximo de inducción de la reacción acrosómica que puede alcanzar la muestra.
2. Otras muestras fueron sometidas a un tratamiento similar, pero se expusieron a la acción de la kisspeptina (10 µM), el ionóforo A23187 (10 µM) o sus respectivos solventes empleando los mismos tiempos de incubación.

Al final del periodo de incubación, los espermatozoides se centrifugaron y, tras la eliminación del sobrenadante, se resuspendieron nuevamente en solución hipoosmótica idéntica a la descrita anteriormente en el apartado de análisis de vitalidad de los espermatozoides. Tras 10 minutos, se lavaron con PBS y se colocaron en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina. Las células se fijaron y permeabilizaron con metanol durante 30 segundos y se dejaron secar al aire. Posteriormente los portaobjetos se incubaron en la oscuridad con 50 µl de solución de FITC-PSA a una concentración de 50 µg/ml durante 30 minutos en cámara húmeda. Pasado este tiempo, los portaobjetos se lavaron con agua bidestilada y se montaron con el medio de montaje Citifluor Solid Mountant Kit (Agar Scientific, Essex, UK). El estado de los acrosomas se evaluó utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX-51. Los espermatozoides que tenían el acrosoma intacto presentaban una señal fluorescente muy intensa en la región acrosomal, mientras que los que ya habían sufrido la reacción acrosómica no

mostraban ninguna señal en esta región o únicamente se observaba la fluorescencia en la región ecuatorial de la cabeza. Se contaron al menos 200 células para cada condición experimental y solo las células positivas para el test hiposmótico (con el flagelo enrollado) se consideraron para este conteo. El porcentaje de reacción acrosómica para cada compuesto en estudio (SP, kisspeptina y A23187) se calculó mediante la siguiente fórmula: (porcentaje de espermatozoides acrosomo-reaccionados en la alícuota tratada con el compuesto) - (porcentaje de espermatozoides acrosomo-reaccionados en la alícuota tratada con su respectivo solvente al mismo tiempo). La reacción acrosómica espontánea se midió realizando el mismo procedimiento antes de la adición de los productos en estudio.

13. ESTUDIOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS BALSAS LIPÍDICAS DURANTE LA REACCIÓN ACROSÓMICA

Sabiendo que uno de los componentes mayoritarios de estas balsas lipídicas es el gangliósido GM₁ por el que muestra una alta afinidad la CTB, podemos visualizar estas estructuras en espermatozoides con el acrosoma intacto o acrosomo-reaccionados conjugando la detección de la CTB con la técnica FITC-PSA de unión a los acrosomas descrita anteriormente. Para llevar a cabo estos experimentos, las muestras de semen se dividieron en dos alícuotas que se incubaron en condiciones capacitantes durante 6 horas a 37°C y 5% CO₂. Tras este tiempo, una alícuota fue tratada con el ionóforo A23187 (10 µM) y la otra con su solvente durante una hora más. Al finalizar este período de incubación, las alícuotas se lavaron con PBS y se resuspendieron en una solución con CTB unido a Alexa Fluor-594 (1 µg/ml) en mHTF durante 10 minutos en oscuridad. Los espermatozoides se lavaron y se resuspendieron en una solución que contenía un anticuerpo anti-CTB desarrollado en conejo (1:100) durante 15 minutos, nuevamente en oscuridad. Por último, las alícuotas se fijaron durante 10 minutos en PFA al 4% en PBS. Todos estos procedimientos (incubaciones y centrifugaciones) se realizaron a 4°C para asegurar la estabilidad de las membranas minimizando la fluidez de la bicapa lipídica. A continuación, y ya a temperatura ambiente, se llevó a cabo el protocolo de tinción acrosomal con FITC-PSA (permeabilización con metanol, incubación con FITC-PSA, lavado y montaje). En este caso el montaje se realizó con Prolong Gold Anteface Reagent con DAPI y las preparaciones se evaluaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX-51. Para cada técnica y tratamiento, se contaron los espermatozoides que presentaban señal en la región acrosomal. En cada alícuota estudiada se evaluaron al menos 200 espermatozoides.

13.1. DISTRIBUCIÓN DE LAS BALSAS LIPÍDICAS, LA SUSTANCIA P Y LA HEMOCININA-1 DURANTE LA REACCIÓN ACROSÓMICA

Siguiendo el esquema experimental anterior, procedimos a analizar si la distribución de las TKs que aparecen en el acrosoma presenta variaciones tras la reacción acrosómica. Para ello, dividimos las muestras de espermatozoides en dos alícuotas que fueron incubadas bajo condiciones capacitantes (6 horas a 37°C y 5% CO₂). Tras este tiempo, una alícuota se trató con el ionóforo A23187 (10 µM) y la otra alícuota con su solvente durante 60 minutos. Posteriormente se realizó la tinción de las balsas lipídicas siguiendo el protocolo descrito en el punto anterior. Tras la fijación con PFA al 4% en PBS, los espermatozoides se extendieron en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina y se fijaron con metanol a -20°C durante 20 minutos. Tras este paso, los portaobjetos se bloquearon con caseína al 2% en PBS durante 2 horas para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios. La incubación con los anticuerpos primarios policlonales que reconocían a SP y a HK-1, a las diluciones recogidas en la Tabla 10, se realizó durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente y tras varios lavados en PBS, las muestras se incubaron durante 60 minutos con un anticuerpo secundario conjugado con FITC (Tabla 10). Finalmente, las preparaciones se montaron con el medio Prolong Gold (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR) conteniendo DAPI que se une específicamente al núcleo y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX-51.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada grupo de experiencias se calcularon los parámetros de distribución media aritmética y error estándar de la media. Todos los valores numéricos se han expresado como medias \pm error estándar de la media para un número n de experiencias en n donantes de semen diferentes.

Según las características de los datos a comparar, utilizamos los siguientes test estadísticos:

1. Comparaciones entre dos medias:
 - a. Para distribuciones normales: test de la t de Student para muestras pareadas o para muestras independientes, según el caso.
 - b. Para distribuciones no paramétricas: test de la U de Mann-Whitney.
2. Comparaciones entre más de dos medias:
 - a. Para distribuciones normales: análisis de varianza (ANOVA).
 - b. Para distribuciones no paramétricas: test de Kruskal-Wallis.

Para la aplicación de estos test estadísticos se utilizó el programa GRAPHPAD PRISM (versión 5.0; GRAPHPAD Software Inc., San Diego, CA, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de $P < 0,05$.

IV. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL



1. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS. IMPLICACIÓN EN LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA Y POSIBLES EFECTOS ADVERSOS DE SU ACTIVACIÓN

1.1 EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS EN LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Los ARNm de los genes que codifican los distintos receptores taquicinérgicos, *TACR1*, *TACR2* y *TACR3*, no se detectaron en espermatozoides humanos maduros empleando técnicas de PCR. Sin embargo, los fragmentos de amplificación esperados para cada uno de estos genes sí se observaron en el control positivo, formado por un pool de ARNs procedentes de 20 tejidos humanos diferentes. Dichos fragmentos no aparecen en ninguno de los controles negativos; uno realizado en ausencia de la transcriptasa inversa en la reacción, que descarta la presencia de ADN genómico, un segundo realizado en ausencia de ARN en la amplificación y un último control, consistente en la no adición de espermatozoides durante la extracción, que descarta la contaminación con la secuencia diana durante la purificación del ARNm y/o síntesis de ADNc.

En paralelo, detectamos la expresión de los dos genes usados como control interno: *GAPDH* y *ACTB*, tanto en las extracciones correspondientes a los espermatozoides como en el control positivo, mientras que no aparecieron bandas en ninguno de los dos controles negativos (Figura 14).

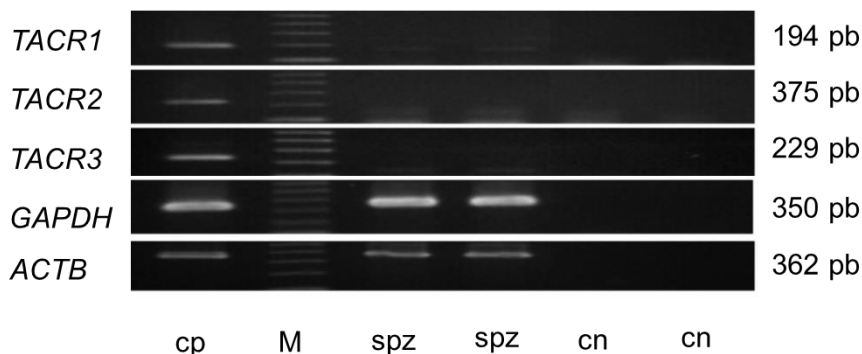


Figura 14: Análisis de la expresión de los ARNm de *TACR1*, *TACR2*, *TACR3*, *GAPDH* y *ACTB* en espermatozoides humanos. La figura muestra la fotografía de un gel de agarosa en el que se observan los productos de amplificación de PCR obtenidos a partir del ADNc de espermatozoides (spz) o una mezcla de ADNc procedente de 20 tejidos diferentes (control positivo de amplificación, cp). Las cantidades de ADNc utilizadas en cada caso fueron equivalentes y se determinaron mediante la amplificación y cuantificación previa de *ACTB* y *GAPDH*, utilizados como controles internos de amplificación. M: marcador de peso molecular; spz: espermatozoides; cn: controles negativos. n=6.

1.2 EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS

El empleo de técnicas de inmunocitoquímica nos permitió detectar la presencia y localización de los receptores NK₁, NK₂ y NK₃ en espermatozoides humanos. La inmunoreactividad positiva del receptor NK₁ se observó fundamentalmente en la región acrosomal de la cabeza, la pieza media y la pieza principal del flagelo (Figura 15). El receptor NK₂ aparece principalmente en la región acrosomal y el segmento ecuatorial de la cabeza, así como a nivel del cuello y la pieza principal del flagelo, siendo particularmente abundante en la región final del flagelo (Figura 15). Por último, la inmunoreactividad positiva del receptor NK₃ se localiza mayoritariamente en la zona postacrosomal de la cabeza y en la pieza media y de forma muy tenue en la pieza principal del flagelo (Figura 15). La especificidad de estos resultados se demostró mediante la desaparición de las señales al realizar la incubación en ausencia del anticuerpo primario (datos no mostrados).

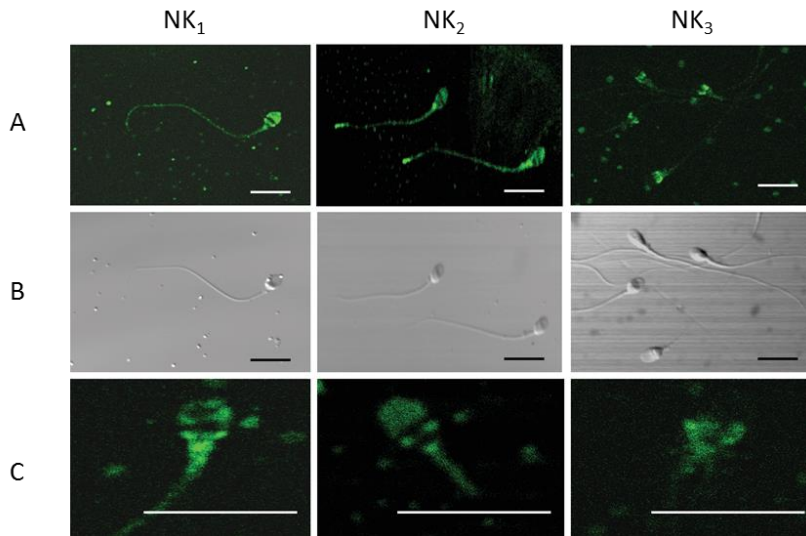


Figura 15: Inmunodetección de los receptores NK₁, NK₂ y NK₃ en el espermatozoide humano **(A)** Imágenes de inmunofluorescencia de espermatozoides teñidos con anticuerpos primarios anti-NK₁, anti-NK₂ y anti-NK₃ donde se muestran las localizaciones específicas de cada receptor. **(B)** Imágenes de contraste de fases correspondientes a cada micrografía de inmunofluorescencia. **(C)** Detalle de la inmunofluorescencia específica para cada receptor. n=6. Barra de escala = 10 μ m.

La presencia de los receptores taquicinérgicos en espermatozoides humanos se confirmó mediante el análisis de Western blot en extractos proteicos obtenidos a partir de dichas células. Utilizando anticuerpos policlonales específicos para cada uno de los receptores, detectamos bandas específicas de alrededor de 59 KDa para NK₁, de 52 KDa para NK₂ y de 55 KDa para NK₃. Además, en el caso del receptor NK₂, aparece otra banda secundaria de aproximadamente 105 KDa (Figura 16). Este hecho puede deberse a distintas modificaciones postraduccionales que pueden sufrir estos receptores, como por ejemplo, las glicosilaciones (Wheatley y Hawtin, 1999).

Se observaron bandas del mismo tamaño cuando se realizó el Western blot sobre extractos proteicos de útero humano, utilizado como control positivo, y desaparecieron al omitir el anticuerpo primario del ensayo (datos no mostrados).

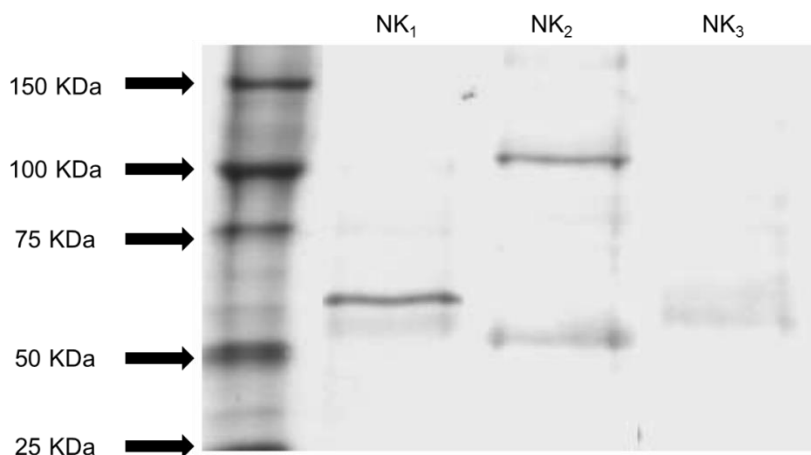


Figura 16: Análisis de Western blot que demuestra la presencia de los tres receptores taquicinérgicos (NK_1 , NK_2 y NK_3) en extractos proteicos de espermatozoides humanos. La banda de la izquierda representa el marcador de peso molecular. Los blots son representativos de los resultados obtenidos en 4 donantes normozoospermicos diferentes.

1.3 EFECTO DE LAS TAQUICININAS EN LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA

En las muestras ensayadas, todas las TKs produjeron un aumento dosis-dependiente de la movilidad progresiva a los 15 minutos de incubación (Figura 17A). De todas ellas, la que mostró mayor potencia fue la SP, que indujo un incremento de la movilidad progresiva a bajas dosis (0,1 nM). Sin embargo, necesitamos una dosis 10 veces más alta (1 nM) para observar los efectos sobre movilidad progresiva del resto de TKs (NKA, NKB y HK-1). El agonista selectivo del receptor NK_3 , [MePhe⁷]-NKB, provocó el mismo efecto sobre la movilidad progresiva a concentraciones superiores (10 nM) (Figura 17B).

El incremento del porcentaje de espermatozoides móviles progresivos fue acompañado por un descenso en el porcentaje de espermatozoides que presentaban una movilidad no progresiva, sin afectar al número de espermatozoides inmóviles. Del mismo modo, se observó que los efectos de las TKs eran mucho más pronunciados cuando la movilidad progresiva inicial era

menor, observándose un respuesta mayor en las muestras C que en las A y B (ver metodología, página 101). La Figura 18 muestra los resultados obtenidos con SP.

Los efectos de la SP, NKA, NKB y HK-1 (1 μ M) sobre la movilidad progresiva se mantuvieron durante períodos largos de incubación y se observaron hasta 4 horas tras la adición de los péptidos (Tabla 15).

Por otro lado, incubando previamente durante 45 minutos con antagonistas selectivos de los distintos receptores taquicinérgicos, pudimos analizar la importancia de cada uno de ellos en el aumento de la movilidad progresiva inducida por las TKs. Tanto el antagonista selectivo del receptor NK₁, SR140333 (10 nM), como el antagonista selectivo del receptor NK₂, SR48968 (10 nM), inhibieron los efectos de las TKs sobre la movilidad progresiva y no progresiva. El antagonista específico del receptor NK₃, SR142801 (10 nM), produjo una inhibición menor de dichos efectos, aunque también significativa. En la figura 19A y 19B se representan los efectos de los distintos antagonistas sobre la SP, aunque el efecto fue similar para el resto de TKs. Por otro lado, los efectos de [MePhe⁷]-NKB, solo fueron inhibidos cuando los espermatozoides se incubaron con SR142801 y no se vieron afectados en presencia de SR140333 o SR48968 (Figura 19C). La incubación con los antagonistas solos no indujo ningún efecto sobre la movilidad espermática (datos no mostrados).

Tabla 15: Efecto de las TKs sobre la movilidad espermática humana tras diversos tiempos de incubación. Los valores de movilidad progresiva en las muestras C se midieron antes y después de añadir las diferentes TKs (1 μ M) o sus correspondientes solventes a determinados tiempos. Los resultados se expresan como media \pm SEM, siendo n el número de experimentos llevados a cabo en n diferentes donantes. * $P < 0,05$ respecto al valor inicial.

TK o solvente	Tiempo de incubación (min)						
	n	0	2	30	60	120	240
SP	5	36,4 \pm 2,5	60,0 \pm 5,5*	68,8 \pm 5,0*	77,2 \pm 6,5*	75,8 \pm 4,7*	70,0 \pm 4,6*
NKA	4	37,3 \pm 3,0	61,3 \pm 7,7*	62,3 \pm 4,8*	59,7 \pm 3,5*	64,7 \pm 3,0*	61,7 \pm 2,8*
NKB	4	37,4 \pm 2,9	57,7 \pm 3,6*	56,3 \pm 2,9*	55,3 \pm 3,6*	54,0 \pm 3,1*	51,0 \pm 5,7*
HK-1	4	36,7 \pm 3,2	70,3 \pm 4,7*	63,0 \pm 5,0*	67,7 \pm 3,3*	69,7 \pm 3,3*	67,0 \pm 2,0*
Solv SP, NKA, HK-1	4	33,0 \pm 3,8	27,8 \pm 4,6	23,8 \pm 5,5	22,5 \pm 5,3	20,9 \pm 6,5	22,8 \pm 6,4
Solv NKB	4	38,0 \pm 3,2	37,5 \pm 1,9	33,5 \pm 3,0	32,0 \pm 5,3	26,0 \pm 6,8*	22,0 \pm 7,5*

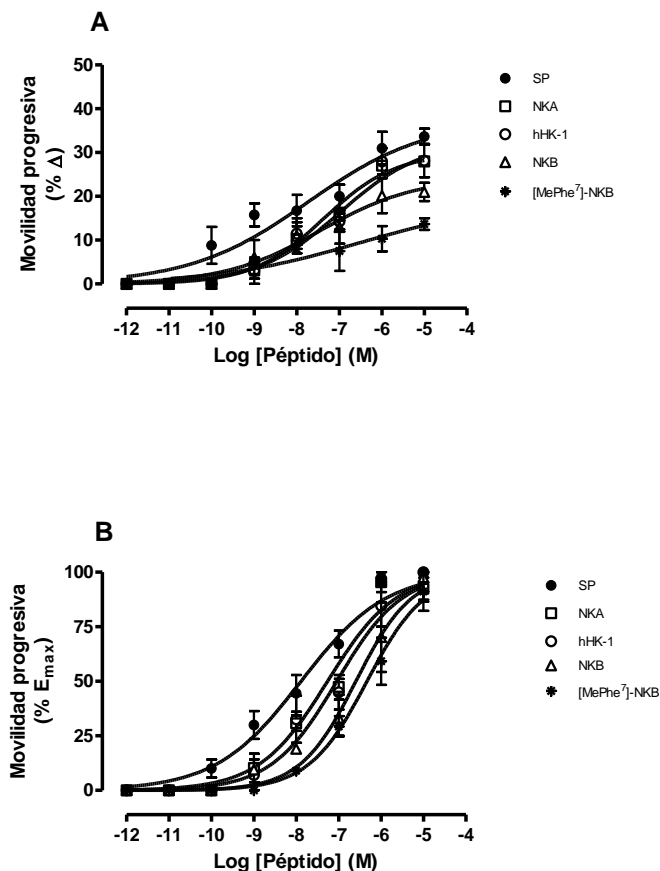


Figura 17: Efectos de las taquicininas (TKs) sobre la movilidad progresiva de espermatozoides humanos tras 15 minutos de incubación. La figura muestra las curvas concentración-respuesta obtenidas para las distintas TKs ensayadas (SP, NKA, NKB, HK-1 y [MePhe⁷]-NKB) a concentraciones comprendidas entre 0,01 nM y 10 μ M en muestras con una movilidad progresiva inicial entre 30 y 45% (muestras C, ver metodología, página 101). **(A)** Respuestas de los diferentes péptidos expresadas como porcentaje de cambio de movilidad progresiva respecto al valor inicial. **(B)** Respuestas de cada uno de los péptidos expresadas como porcentaje de la respuesta máxima producida por cada uno de ellos (E_{max}). Los valores representan medias \pm SEM de 3-10 experimentos, dependiendo de la TK y de la concentración empleada.

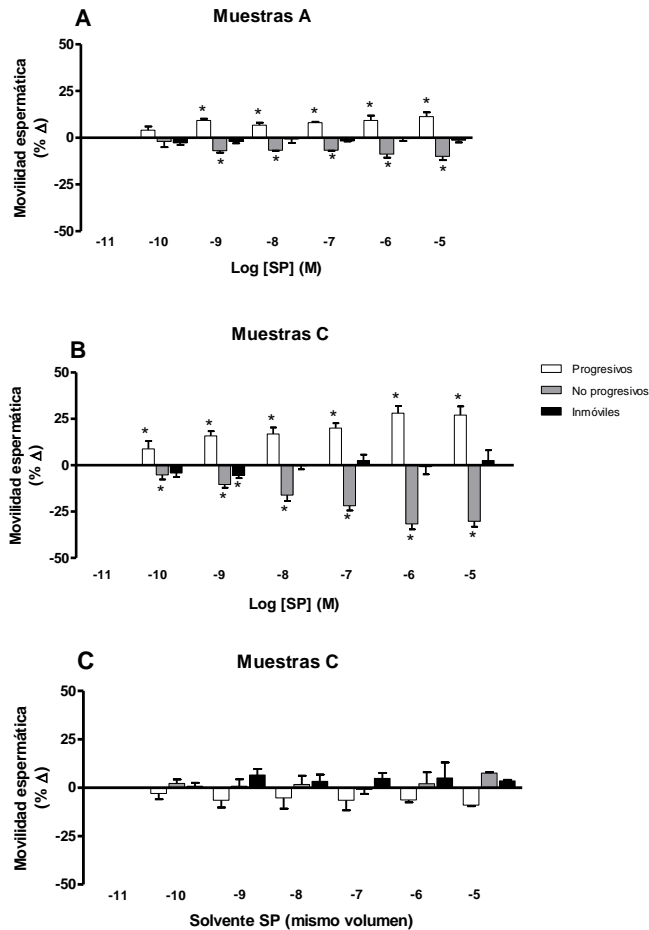


Figura 18: Efecto de la SP (0,01 nM - 10 μ M) sobre la movilidad espermática humana tras 15 minutos de incubación. El análisis de la movilidad se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la OMS y los espermatozoides se dividieron en móviles progresivos (barra blanca), móviles no progresivos (barra gris) e inmóviles (barra negra), expresados como porcentaje del total (100%) en cada muestra. **(A)** Efecto de la SP en muestras A con movilidad progresiva inicial entre 60 y 70% (n=5). **(B)** Efecto de la SP en muestras C con movilidad progresiva inicial entre 30 y 45% (n=8). **(C)** Efecto del solvente de la SP (experiencias control) en muestras C (n=8). Los resultados representados son medias \pm SEM. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto a las respuestas observadas en los controles pareados incubados con el solvente.

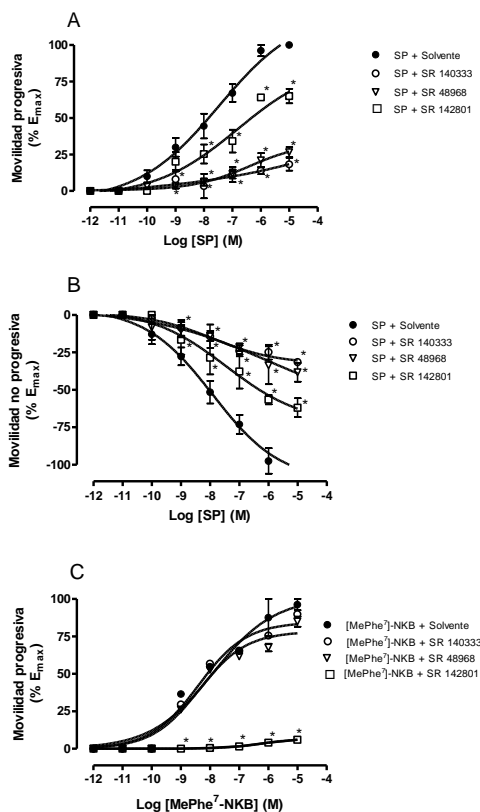


Figura 19: Curvas concentración-respuesta para la SP y la [MePhe⁷]-NKB (0,01 nM – 10 μ M, 15 minutos de incubación) en muestras de espermatozoides preincubadas durante 45 minutos con SR140333 (10 nM, antagonista selectivo del receptor NK₁), SR48968 (10 nM, antagonista selectivo del receptor NK₂), SR142801 (10 nM, antagonista selectivo del receptor NK₃) o su correspondiente solvente (curvas control). La figura muestra los resultados obtenidos en muestras de movilidad C (con movilidad progresiva inicial entre 30 y 45%). **(A)** Efectos de la SP sobre la movilidad progresiva. **(B)** Efectos de la SP sobre la movilidad no progresiva. **(C)** Efectos de la [MePhe⁷]-NKB sobre la movilidad progresiva. Los datos se han expresado como porcentaje de la respuesta máxima (E_{max}) de los agonistas en las alícuotas de control. Los valores representados son medias \pm SEM de 5-16 experimentos. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto a las respuestas en los correspondientes controles.

Para analizar los efectos de la SP sobre los parámetros cinéticos de la movilidad espermática, se empleó el sistema computerizado CASA en muestras de espermatozoides de diferentes movilidades iniciales (muestras A, B y C). En el caso de los parámetros de velocidad, la adición de SP ($1\ \mu\text{M}$) produjo un aumento de VCL, VSL y VAP. Los valores obtenidos fueron estadísticamente significativos a los 15 y a los 60 minutos para VCL, a los 15 minutos para VSL y a los 2, 15, 30 y 60 minutos para VAP (Figura 20). En el caso de los índices que describen las trayectorias de los espermatozoides, tras la adición de SP se observó un breve aumento de los mismos (Figura 21), siendo solo estadísticamente significativo el que se producía en LIN a los 30 minutos. Este aumento fue seguido de un breve descenso en estos parámetros a partir del minuto 30, que solo alcanzó significación estadística en el caso del índice WOB a los 240 minutos. No se observó ningún cambio significativo a ninguno de los tiempos analizados para STR (Figura 21). Por otro lado, la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides (ALH) aumentó en los espermatozoides tratados con SP, pero el incremento solo fue significativo a los 60 y 120 minutos. Por último, la frecuencia de batido flagelar (BCF) no se vio modificada por la acción de la SP sobre la movilidad espermática (Figura 22).

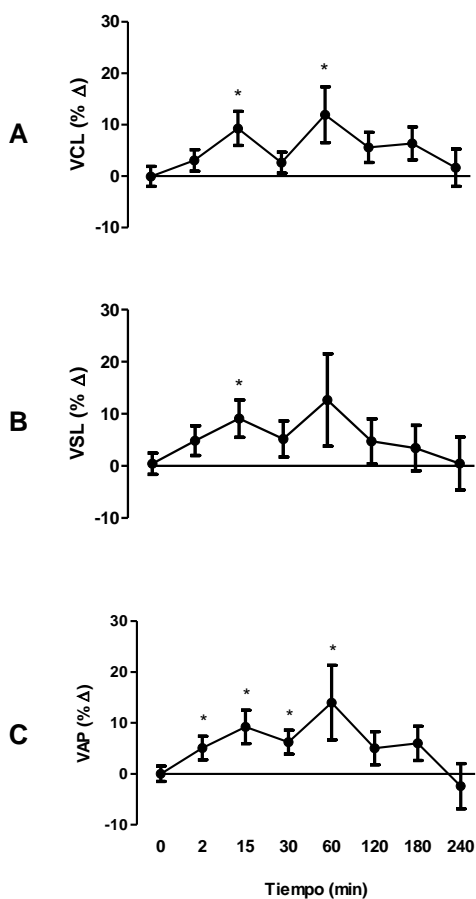


Figura 20: Efecto de la SP (1 μM) sobre los parámetros de velocidad de la movilidad espermática tras diversos tiempos de incubación. **(A)** Efecto de la SP sobre la velocidad curvilínea VCL (n=15) **(B)** Efecto de la SP sobre la velocidad rectilínea VSL (n=15) **(C)** Efecto de la SP sobre la velocidad promedio VAP (n=15). Los resultados fueron normalizados mediante la fórmula $(\text{tratamiento}-\text{control})/\text{control} \times 100$. Los valores representados son medias \pm SEM. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto al tiempo 0.

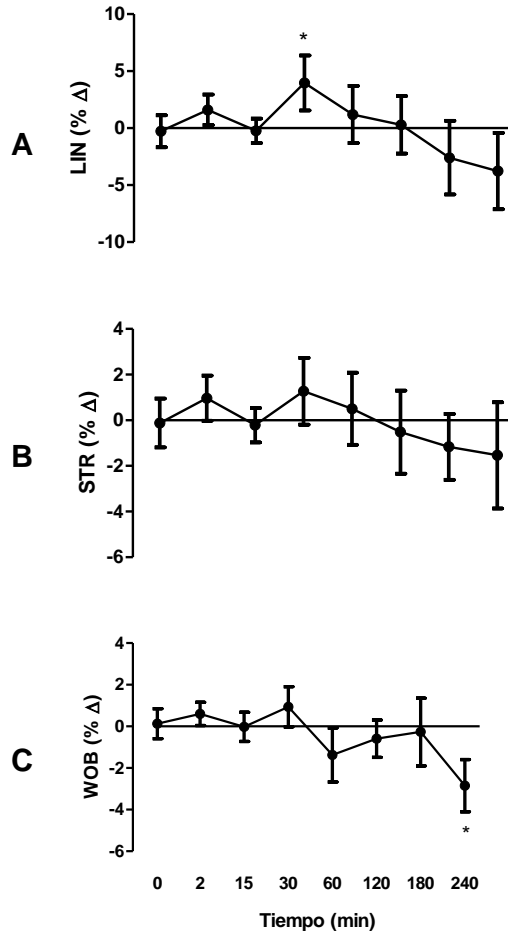


Figura 21: Efecto de la SP (1 μM) sobre los índices de trayectoria de la movilidad espermática tras diversos tiempos de incubación. **(A)** Efecto de la SP sobre el índice de linealidad LIN (n=15) **(B)** Efecto de la SP sobre el índice de rectitud STR (n=15) **(C)** Efecto de la SP sobre el índice de oscilación WOB (n=15). Los resultados fueron normalizados mediante la fórmula (tratamiento-control)/control*100. Los valores se han representado como medias ± SEM. *P<0,05, diferencia significativa respecto al tiempo 0.

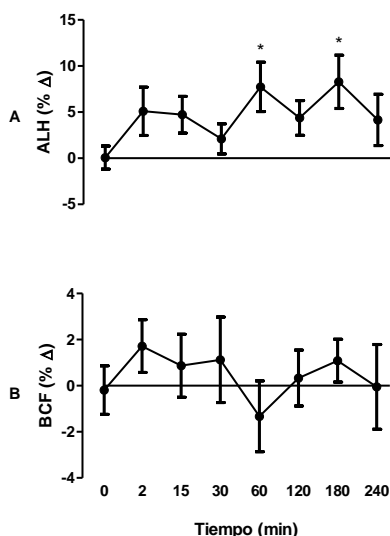


Figura 22: Efecto de la SP (1 μM) sobre los parámetros **(A)** amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, ALH (n=9) y **(B)** frecuencia de batido flagelar, BCF (n=9) tras diversos tiempos de incubación. Los resultados fueron normalizados mediante la fórmula (tratamiento-control)/control*100. Los valores representan medias ± SEM en 15 muestras diferentes. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto al tiempo 0.

1.4 POSIBLES EFECTOS NOCIVOS DE LA SUSTANCIA P EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS: EFECTOS SOBRE VITALIDAD, FRAGMENTACIÓN, APOPTOSIS Y ESTRÉS OXIDATIVO.

Procedimos a determinar si la adición de TKs, además de provocar un aumento en la movilidad progresiva, producía algún daño sobre los espermatozoides humanos. Para ello, añadimos SP (1 μM) a diferentes muestras espermáticas y analizamos sus efectos sobre diversos parámetros relacionados con la viabilidad de los espermatozoides, como la vitalidad, la fragmentación de ADN, la apoptosis y el estrés oxidativo.

Mediante marcaje específico de espermatozoides con anexina V, pudimos comprobar que los niveles de espermatozoides apoptóticos no fueron modificados en presencia de SP ni a tiempos cortos de exposición ni a tiempos largos. Por otro lado, los niveles de estrés oxidativo en los espermatozoides, medidos mediante DHE, tampoco se vieron alterados por la adición de SP. A pesar de no presentar significación estadística, parece que la tendencia nos muestra un leve efecto antioxidante de la SP ya que a todos los tiempos ensayados el nivel de estrés oxidativo de la alícuota tratada con SP fue menor que la que solo fue expuesta a su solvente. Del mismo modo, los niveles de fragmentación del ADN espermático permanecieron inalterados tras el tratamiento con SP. Por último, empleando dos técnicas diferentes de análisis de la vitalidad (test hiposmótico y tinción con eosina/nigrosina) observamos que la adición de SP no provoca ninguna variación significativa respecto a su solvente (Figura 23).

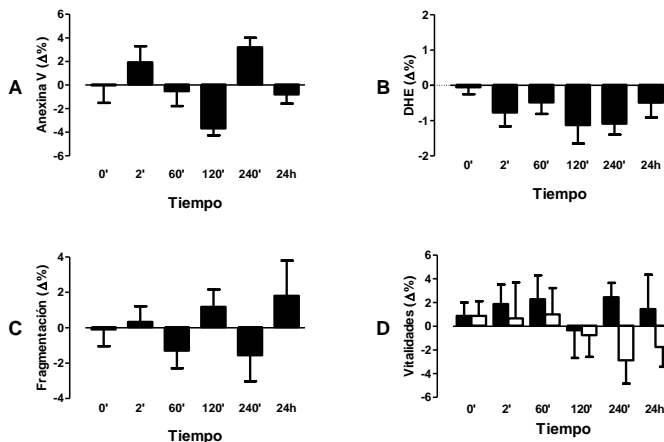


Figura 23: Posibles efectos nocivos de la SP (1 µM) tras incubación de los espermatozoides con la TK a diversos tiempos. **(A)** Análisis de la apoptosis mediante anexina V (n=9) **(B)** Análisis del estrés oxidativo mediante DHE (n=8). **(C)** Análisis de la fragmentación del ADN mediante la técnica de TUNEL (n=9). **(D)** Análisis de la vitalidad mediante el test hiposmótico (barra negra) y la tinción de eosina/nigrosina (barra blanca) (n=9). Los resultados fueron normalizados mediante la fórmula (tratamiento-control) para cada uno de los tiempos estudiados. Los valores se han representado como medias ± SEM. No se hallaron diferencias significativas respecto al tiempo 0 en ninguno de los parámetros analizados.

2. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LAS TAQUICININAS Y SUS PRINCIPALES ENZIMAS DEGRADADORAS (NEP Y NEP2) EN TESTÍCULO, PLASMA SEMINAL Y ESPERMATOZOIDES HUMANOS. IMPLICACIÓN EN LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA.

2.1. EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS TAQUICININAS Y DE LA NEP Y LA NEP2 EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Los ARNm de los genes que codifican la SP/NKA (*TAC1*), la NKB (*TAC3*), la HK-1 (*TAC4*), la NEP (*MME*) y la NEP2 (*MMEL1*) se detectaron en los espermatozoides y testículos humanos ensayados, así como en el pool de 20 tejidos humanos usado como control positivo. En espermatozoides, los ARNm de *TAC4* y de *MME* solo se observaron tras la reamplificación del ADNc. Mediante la utilización de primers específicos y reamplificación del ADNc, observamos que, entre los isoformas del gen *TAC1*, solo se detectan en espermatozoides humanos los transcritos γ y δ . Sin embargo, en testículos humanos pudimos ver la expresión de los isoformas β , γ y δ , éste último solamente tras reamplificación del ADNc (Figura 24). Por otro lado, las variantes de splicing del gen *TAC4* fueron localizadas en el control positivo pero no en los ADNc de espermatozoides ni de testículo (datos no mostrados).

En todas las extracciones de espermatozoides verificamos la presencia del gen *ACR* y la ausencia del gen *CD4*, lo que permite asegurar la especificidad de la extracción. Por el contrario y como cabía esperar, ambos genes se detectaron en las extracciones de testículos humanos (Figura 24). En todos los experimentos se introdujeron tres controles negativos (sin transcriptasa reversa, sin ARN en la reacción de la transcriptasa reversa y sin ADNc) sin que se

observara en ninguno de los casos la aparición de productos de reacción de la PCR.

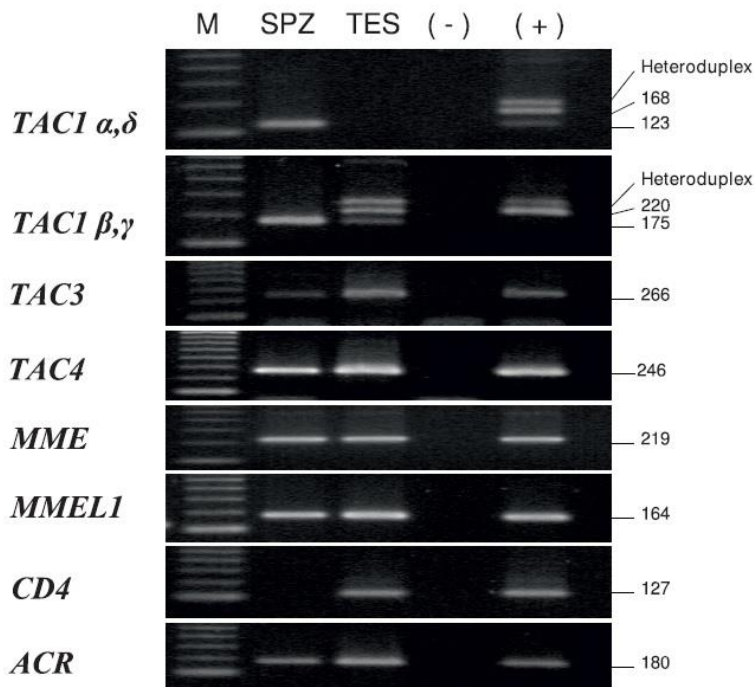


Figura 24: Análisis de la expresión de los ARNm de *TAC1*, *TAC3*, *TAC4*, *MME*, *MMEL1*, *CD4* y *ACR* por PCR en espermatozoides humanos. Los isoformas del gen *TAC1* y los transcritos de los genes *TAC4* y *MME* solo fueron detectados tras reamplificación del ADNc. M: marcador de peso molecular; SPZ: espermatozoides; TES: testículo; (-): control negativo; (+): control positivo (mezcla de ADNc procedente de 20 tejidos humanos diferentes). n=6.

2.2. LOCALIZACIÓN DE LAS TAQUICININAS EN ESPERMATOZOIDES Y TESTÍCULO HUMANO

Empleando técnicas de inmunocitoquímica, demostramos la presencia de todas las TKs en las células espermáticas (Figura 25). El marcaje para la SP apareció de forma intensa en la región acrosomal. También se observó

inmunoreactividad alrededor del cuello y/o en la pieza principal del flagelo en aproximadamente un 15% de los espermatozoides analizados. La NKA se localizó principalmente alrededor del cuello con una señal de menor intensidad en la cabeza y en la pieza principal del flagelo. La inmunoreactividad positiva para la NKB se observó en el segmento ecuatorial de la cabeza y con menor intensidad en la región postacrosomal de la misma. La HK-1 presentó una intensa inmunofluorescencia en la región acrosomal de la cabeza y en el flagelo, fundamentalmente en la pieza media, y de forma más leve en el cuello. Las señales de inmunofluorescencia no aparecieron cuando los anticuerpos específicos para las TKs SP, NKA y HK-1 fueron preincubados con los respectivos péptidos inmunógenos a las concentraciones recomendadas por el laboratorio fabricante (5 µg/ml), poniendo de manifiesto la especificidad de estos anticuerpos. En el caso de la NKB, se utilizaron dos anticuerpos primarios diferentes, observándose una localización idéntica en ambos casos.

En paralelo, utilizamos técnicas de inmunohistoquímica para estudiar la presencia de la SP y la HK-1 en cortes de testículo humano. Ambos péptidos aparecen localizados en los túbulos seminíferos pero mientras que la SP muestra inmunoreactividad positiva en todo el túbulo, con una mayor intensidad en la periferia del mismo, la HK-1 tiene una mayor presencia en las zonas más cercanas a la luz del túbulo (Figura 26).

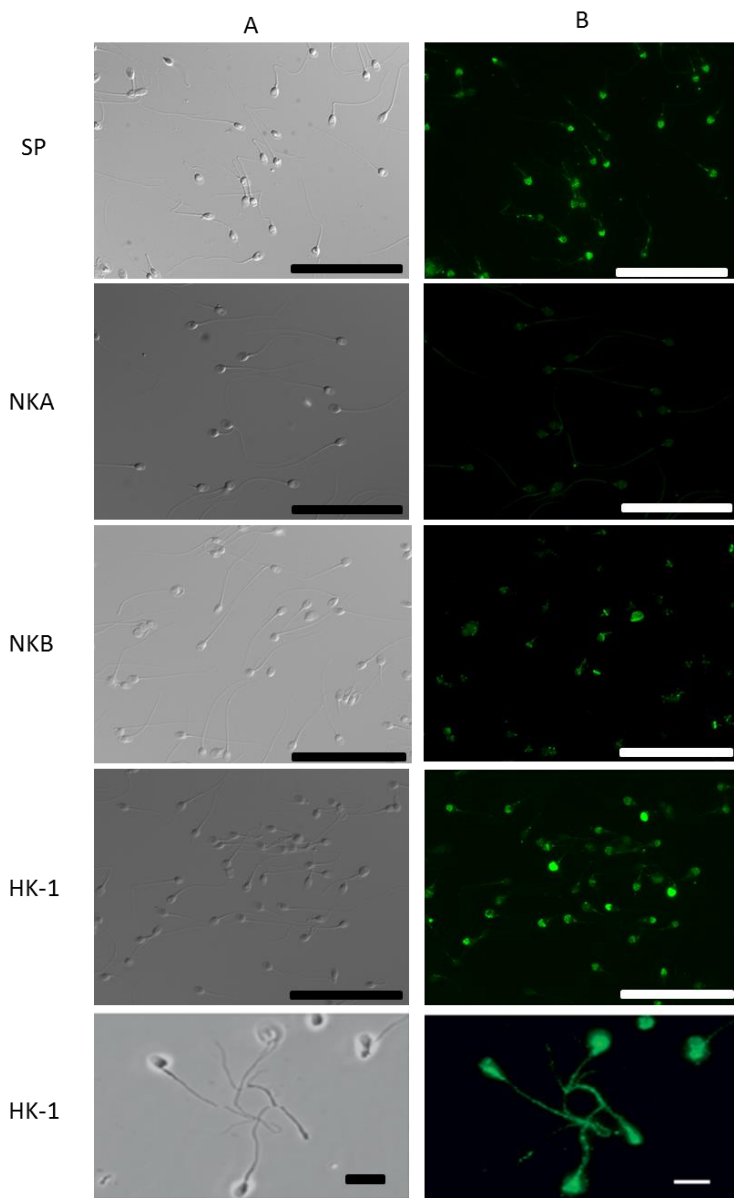


Figura 25: Localización por inmunofluorescencia de las taquicinas SP, NKA, NKB y HK-1 en espermatozoides humanos capacitados. **(A)** Imagen de contraste interdifereencial. **(B)** Imagen de inmunofluorescencia para cada péptido donde se pone de manifiesto la localización específica para cada uno de ellos. Barra de escala = 50 μm , excepto para la última pareja de imágenes, donde la barra representa 10 μm , $n=6$.

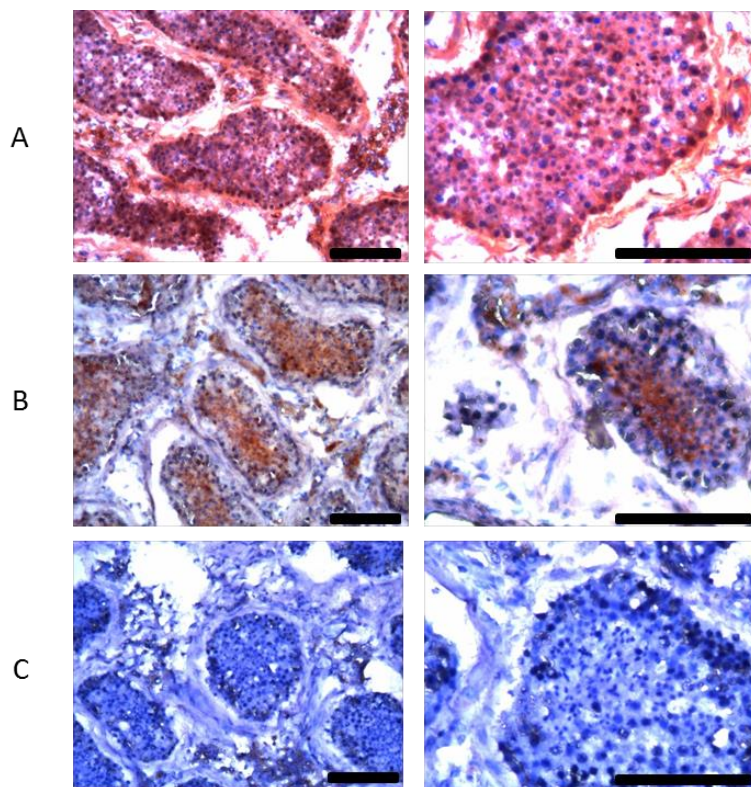


Figura 26: Localización de (A) la SP y (B) la HK-1 en cortes de testículo humano. Las imágenes (C) son controles negativos donde solo se aprecia la tinción hemaioxilina-eosina. La inmunoreactividad positiva para la SP y la HK-1 se observa en los túbulos seminíferos del testículo humano. Barra de escala = 100 μ m, n=3.

2.3. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA NEP Y LA NEP2 EN PLASMA SEMINAL Y ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Mediante técnicas de inmunofluorescencia detectamos la presencia de las enzimas NEP y NEP2 en espermatozoides humanos, además de poner de manifiesto su localización en los mismos. La inmunoreactividad positiva de la

NEP se observó en el segmento ecuatorial de la cabeza espermática en la mayoría de los espermatozoides analizados en cada una de las preparaciones (aproximadamente el 80%). En una pequeña población de espermatozoides (aproximadamente un 3%), la NEP se localizó en el cuello y fue indetectable en el resto de las células (el 17% aproximadamente). La NEP2 se localizó en el segmento ecuatorial y en la región postacrosomal en casi la totalidad de las células analizadas (Figura 27). En los ensayos negativos, realizados en ausencia del anticuerpo primario no apareció ningún tipo de señal positiva (datos no mostrados).

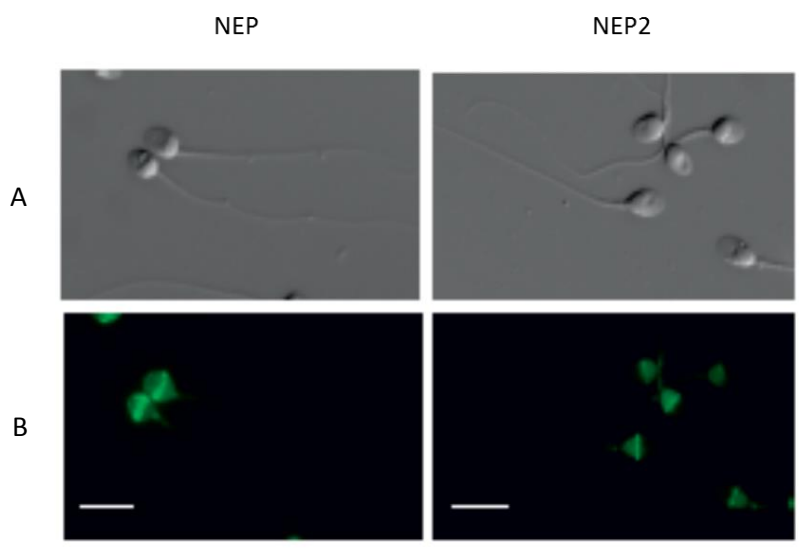


Figura 27: Localización por inmunofluorescencia de la NEP y la NEP2 en espermatozoides humanos capacitados. **(A)** Imagen de contraste interferencial. **(B)** Imagen de inmunofluorescencia para cada enzima donde se pone de manifiesto la localización específica para cada uno de ellos. Barra de escala = 10 μ m, n=6.

La presencia de las enzimas NEP y NEP2 en espermatozoides y en plasma seminal se analizó también mediante Western blot. El anticuerpo empleado para localizar la NEP reconoció una banda de aproximadamente 100 kDa en el extracto proteico de plasma seminal que, sin embargo, no fue visualizada en el extracto proteico obtenido a partir de los espermatozoides (Figura 28). El anticuerpo contra la NEP2, HPA 007876, reconoció una banda de

aproximadamente 90 kDa, el tamaño esperado para el isoformo mayor unido a membrana de dicha proteína. Adicionalmente utilizamos un segundo anticuerpo recomendado para la localización de la enzima NEP2 mediante Western blot, el sc-104450. Dicho anticuerpo también se unió a una banda de unos 90 kDa, tanto en plasma seminal como en espermatozoides. En el plasma seminal se observó una banda adicional, de alrededor de 130 kDa, que podría corresponder a la forma soluble de la NEP2 o a un segundo isoformo de NEP2 asociado a membrana. Además, este anticuerpo reconoció una tercera banda de unos 50 kDa, tanto en el plasma seminal como en los espermatozoides, cuya identidad se desconoce hasta el momento.

Las señales obtenidas con estos tres anticuerpos no aparecen en los controles negativos realizados en ausencia del anticuerpo primario, lo que confirma su especificidad.

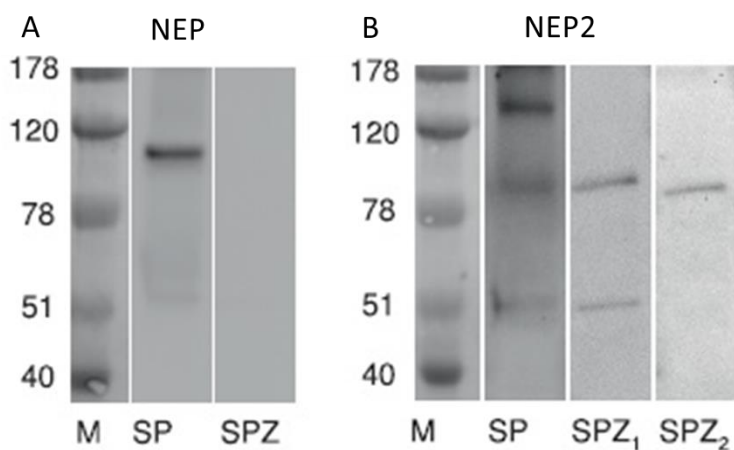


Figura 28: Análisis mediante Western blot de la presencia de la NEP (A) y la NEP2 (B) en extractos proteicos de espermatozoides humanos (SPZ) y de plasma seminal (SP). Para la NEP2, SP y SPZ₁ representan el resultado obtenido con el anticuerpo sc-104450 y SPZ₂ el obtenido con el anticuerpo HPA 007876. M: marcador de peso molecular. n=5.

2.4. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA NEP Y LA NEP2 POR FOSFORAMIDÓN EN LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA

El fosforamidón, un inhibidor selectivo de la NEP y la NEP2, provocó un aumento en el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos (Figura 29). Al igual que ocurre al estudiar los efectos de las TKs, el aumento de movilidad progresiva va asociado a una disminución del porcentaje de espermatozoides no progresivos en la muestra. Observamos que los efectos del fosforamidón dependían tanto de la concentración como del tiempo de exposición de los espermatozoides al compuesto. El aumento de la movilidad progresiva se observó a los 60, 120 y 240 minutos de incubación con el fosforamidón a las concentraciones de 100 nM y 1 μ M (Figura 29A). En todos los casos se realizaron controles pareados con el fin de asegurar que el solvente del fosforamidón no afectaba la movilidad progresiva de las muestras ensayadas. Además, la amplitud de la respuesta al fosforamidón fue inversamente proporcional al porcentaje inicial de móviles progresivos en la muestra ensayada. Así, en alícuotas donde la movilidad progresiva basal era de 45-60%, el porcentaje de espermatozoides de este tipo alcanzó un valor de $64,8 \pm 3,8\%$ tras el tratamiento con fosforamidón 1 μ M durante 60 minutos (Figura 29B). En las alícuotas control de las mismas muestras, que fueron tratadas en paralelo con el solvente de dicho compuesto, los niveles de movilidad progresiva fueron de $51,0 \pm 3,2\%$ ($P < 0,05$).

Los resultados obtenidos fueron similares tanto cuando la movilidad de las muestras se midió manualmente como cuando se hizo mediante el sistema computerizado CASA. Adicionalmente, el empleo del CASA, permitió observar que el incremento de la movilidad progresiva producida por el fosforamidón se debía principalmente al aumento de los espermatozoides de movilidad progresiva rápida tipo a (Figura 29C).

Con el fin de analizar si la respuesta al fosforamidón estaba mediada por la activación de los receptores taquicinérgicos, realizamos experimentos en presencia de antagonistas selectivos de cada uno de los tres receptores taquicinérgicos. Observamos que el efecto del fosforamidón sobre la movilidad progresiva se reducía cuando la muestra de espermatozoides se preincubaba

durante 45 minutos con el antagonista selectivo del receptor NK₁ SR140333 (10 nM) o con el antagonista selectivo del receptor NK₂ SR48968 (10 nM). Sin embargo, no se apreció reducción en presencia del antagonista selectivo del receptor NK₃ SR142801 (10 nM) (Figura 30). Cuando se preincubaron las muestras durante 45 minutos con un cocktail de los tres antagonistas (cada uno de ellos a una concentración final de 10 nM), se volvió a observar una reducción pero no una desaparición completa del efecto sobre la movilidad progresiva del fosforamidón (Figura 30). En experiencias control realizadas en paralelo, comprobamos que los solventes de los antagonistas no tenían ningún efecto sobre la respuesta del fosforamidón.

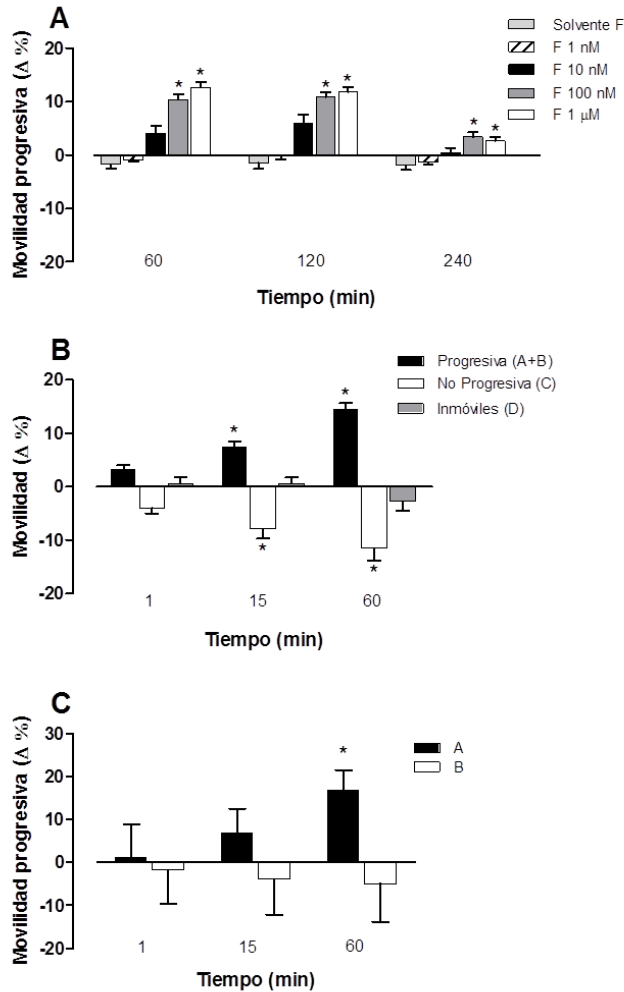


Figura 29: Efectos del fosforamidón sobre la movilidad espermática humana tras diversos tiempos de incubación. **(A)** Efecto del fosforamidón (1 nM - 1 μ M) o su solvente sobre la movilidad progresiva de los espermatozoides humanos (n=6-14). **(B)** Efecto del fosforamidón (1 μ M) sobre el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva, con movilidad no progresiva o inmóviles (n=12). **(C)** Efecto del fosforamidón (1 μ M) sobre el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva de grado *a* y de grado *b* (n=9). Los valores representados son medias \pm SEM. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto a las respuestas en los controles pareados con el solvente del fosforamidón.

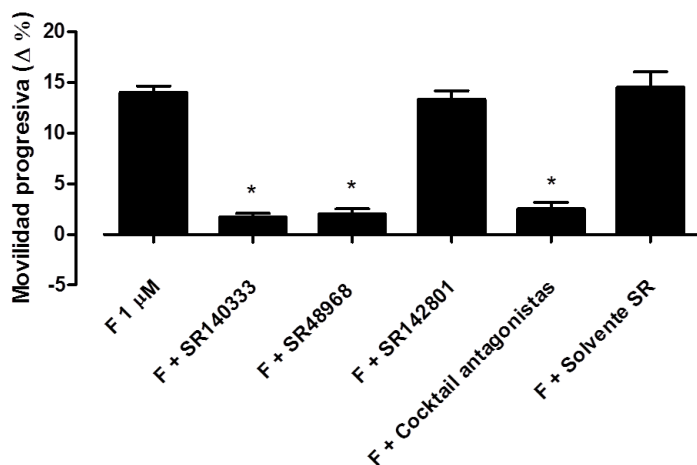


Figura 30: Efectos del fosforamidón sobre la movilidad espermática humana en ausencia o presencia del antagonista selectivo del receptor NK_1 SR140333 (10 nM), del antagonista selectivo del receptor NK_2 SR489608 (10 nM), del antagonista selectivo del receptor NK_3 SR142801 (10 nM), de una combinación de los tres (cocktail) o de los solventes de dichos antagonistas. Las medidas de movilidad se realizaron a los 60 minutos de la adición del fosforamidón. Los valores representados son medias \pm SEM (n=6-8). * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto a las respuestas en los controles pareados en presencia de los correspondientes solventes.

3. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA KISSPEPTINA Y SU RECEPTOR EN TESTÍCULO Y ESPERMATOZOIDES HUMANOS. IMPLICACIÓN EN LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA

3.1. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE LA KISSPEPTINA EN LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Para el estudio de la localización del receptor de la kisspeptina se realizaron experimentos de inmunocitoquímica con el anticuerpo específico contra KISS1R. La inmunoreactividad positiva se localizó principalmente en el segmento ecuatorial, en la región acrosomal de la cabeza y alrededor del cuello en aproximadamente el 95% de los espermatozoides analizados en cada una de las preparaciones ensayadas (n=6). Además, entre un 30 y un 40% de los espermatozoides mostraron un marcaje algo menos intenso en la pieza media del flagelo, un hecho que también se apreció en cada una de las muestras analizadas (Figura 31). La inmunolocalización de KISS1R fue bastante homogénea en las preparaciones de espermatozoides procedentes de distintos donantes.

El análisis de los extractos proteicos de espermatozoides mediante Western blot con el mismo anticuerpo específico que se utilizó en inmunocitoquímica confirmó la presencia del receptor específico de la kisspeptina (KISS1R) en estas células (Figura 32). El anticuerpo anti-KISS1R humano reconoció una banda de aproximadamente 43 kDa, el peso molecular esperado. Además, también se unió a otras bandas de tamaño similar, que podrían ser producto de pequeñas modificaciones postranscripcionales de la proteína. Las mismas bandas se observaron en el extracto proteico de placenta humana, utilizado como control positivo. Por otro lado, cuando se omitió el anticuerpo primario, no aparecieron bandas en ninguno de los ensayos llevados a cabo (datos no mostrados).

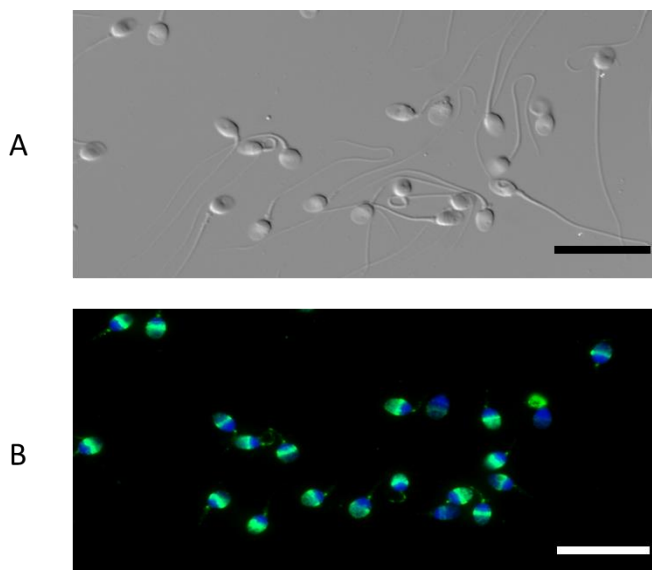


Figura 31: Localización por inmunofluorescencia del receptor de la kisspeptina KISS1R en espermatozoides humanos capacitados. **(A)** Imagen de contraste interferencial. **(B)** Imagen de inmunofluorescencia donde se pone de manifiesto la localización específica de KISS1R. El núcleo de los espermatozoides está teñido con DAPI. Barra de escala = 20 μm , n=6.

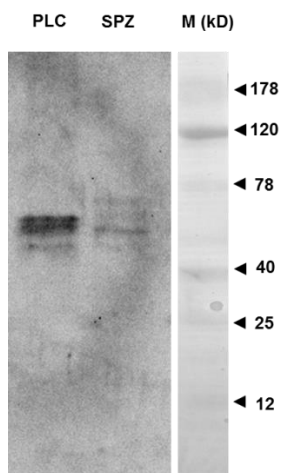


Figura 32: Análisis mediante Western blot de la presencia de la KISS1R en extractos proteicos de espermatozoides humanos (SPZ) y de placenta (PLC). M: marcador de peso molecular. n=5.

3.2. LOCALIZACIÓN DE LA KISSPEPTINA EN ESPERMATOZOIDES Y TESTÍCULO HUMANO. COLOCALIZACIÓN CON SU RECEPTOR ESPECÍFICO Y CON LA NEUROKININA B

Empleando técnicas de inmunofluorescencia, observamos inmunoreactividad positiva para la kisspeptina en el 100% de los espermatozoides analizados y en todas las muestras donde se llevaron a cabo los ensayos (Figura 33). El marcaje fue especialmente intenso en el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide, aunque también aparecía señal en la región postacrosomal. En muchos espermatozoides, también se observó la presencia de la kisspeptina en la zona del cuello y en cuatro de las seis preparaciones se apreció inmunoreactividad en la pieza media del flagelo. Las experiencias se realizaron con dos anticuerpos específicos contra la kisspeptina, de dos casas comerciales distintas, y los resultados obtenidos fueron similares en ambos casos.

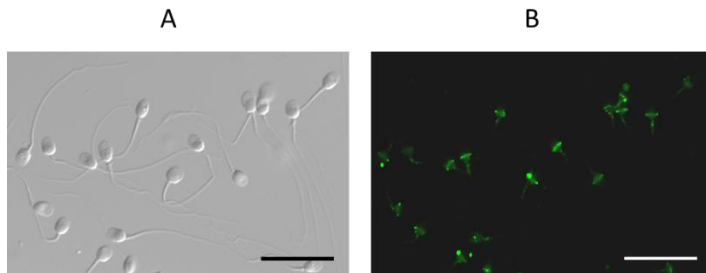


Figura 33: Localización por inmunofluorescencia de la kisspeptina en espermatozoides humanos capacitados. **(A)** Imagen de contraste interferencial. **(B)** Imagen de inmunofluorescencia donde se pone de manifiesto la localización específica para la kisspeptina. Barra de escala = 20 μm , n=6.

Del mismo modo, realizamos experimentos de doble inmunofluorescencia para estudiar la coexpresión de la kisspeptina y su receptor específico KISS1R en las células espermáticas humanas. Pudimos observar que la colocalización de ambas proteínas se producía principalmente en la región del segmento ecuatorial (Figura 34).

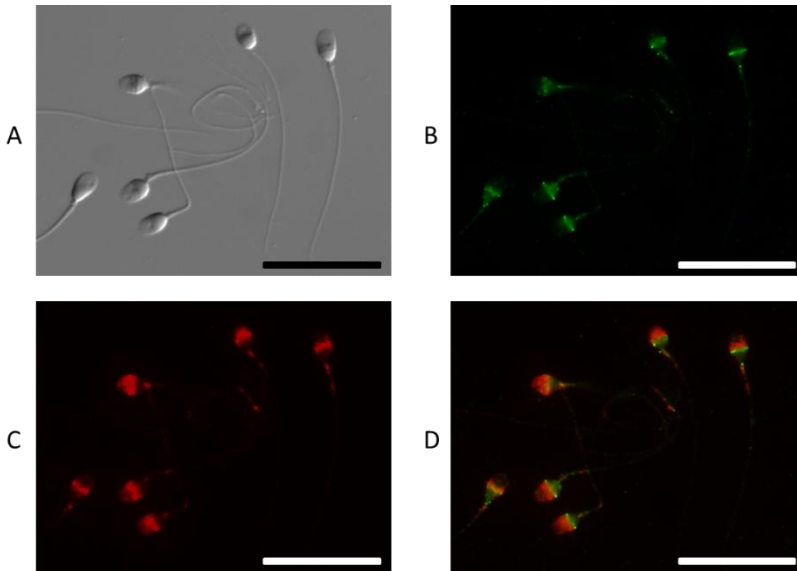


Figura 34: Colocalización por inmunofluorescencia de la kisspeptina y de KISS1R en espermatozoides humanos capacitados. **(A)** Imagen de contraste interferencial. **(B)** Imagen de inmunofluorescencia donde se pone de manifiesto la localización específica de la kisspeptina (señal verde). **(C)** Imagen donde se pone de manifiesto la localización específica de KISS1R (señal roja). **(D)** Unión de las dos imágenes anteriores donde se representa en amarillo las zonas donde colocalizan ambas proteínas. Barra de escala = 20 μm , n=6.

En paralelo, realizamos otros experimentos de inmunocitoquímica de doble marcaje con los anticuerpos anti-kisspeptina y anti-NKB. Encontramos que tanto la kisspeptina como la NKB mostraron la misma localización descrita anteriormente (Figuras 25 y 33) y confirmamos la colocalización casi total de ambos péptidos en los espermatozoides humanos, principalmente en el segmento ecuatorial (Figura 35).

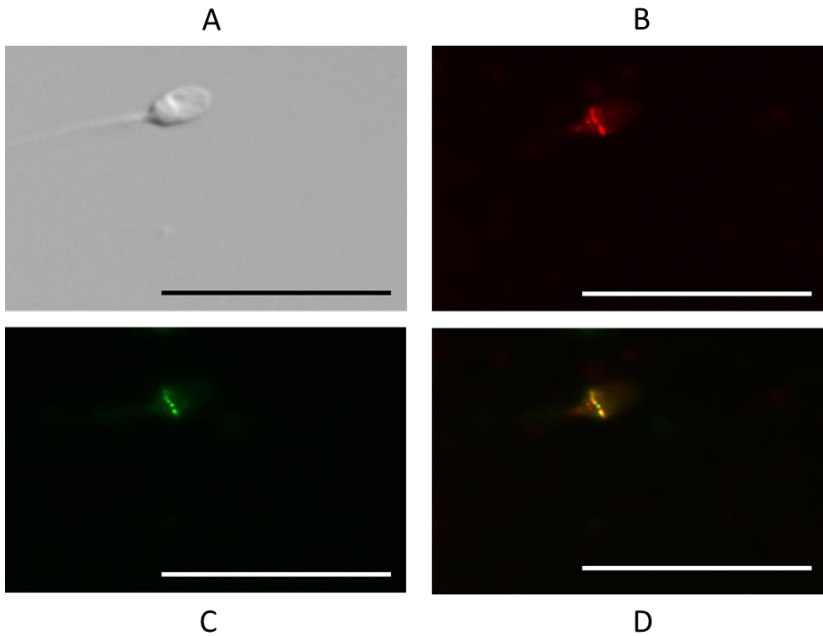


Figura 35: Colocalización por inmunofluorescencia de la kisspeptina y la NKB en espermatozoides humanos capacitados. **(A)** Imagen de contraste interferencial. **(B)** Imagen de inmunofluorescencia donde se pone de manifiesto la localización específica de la NKB (señal roja). **(C)** Imagen donde se pone de manifiesto la localización específica de la kisspeptina (señal verde). **(D)** Unión de las dos imágenes anteriores donde se representa en amarillo las zonas donde colocalizan ambos péptidos. Barra de escala = 20 μm , $n=6$.

Por último, estudiamos la localización de la kisspeptina en cortes de testículo humano mediante técnicas de inmunohistoquímica. En este caso, la kisspeptina aparece en las células de Leydig que rodean los túbulos y en las células periféricas del interior de los túbulos, observándose una difusión de la inmunoreactividad hacia el interior de la luz de los mismos (Figura 36).

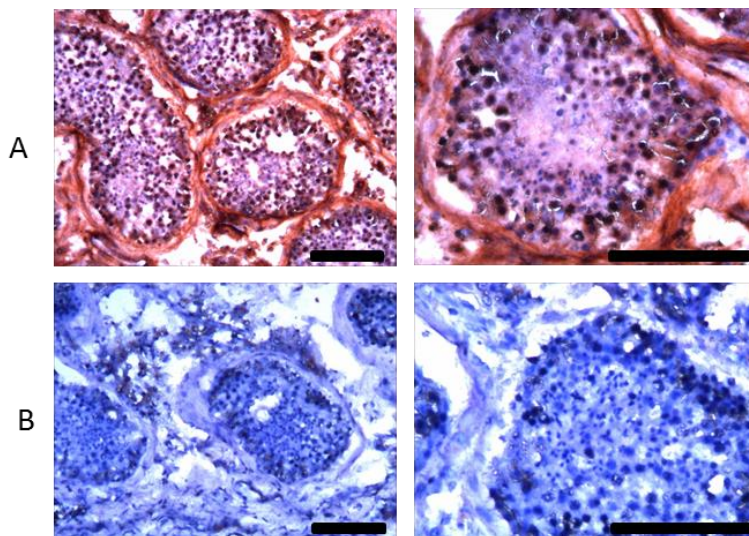


Figura 36: Localización de (A) la kisspeptina en cortes de testículo humano. Las imágenes (B) son controles negativos donde solo se aprecia la tinción hemaoxilina-eosina. La inmunoreactividad positiva para la kisspeptina se observa en el interior de los túbulos seminíferos del testículo humano y, fundamentalmente, en las células que los rodean. Barra de escala = 100 μm , $n=3$.

3.3. EFECTO DE LA KISSEPTINA EN LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA

La kisspeptina a las concentraciones de 10 y 100 nM no mostró ningún efecto sobre la movilidad espermática. Sin embargo, a 1 μM , la kisspeptina produjo un aumento del porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva rápida tipo a, acompañado de un descenso proporcional del porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva lenta tipo b, sin llegar a producir un cambio en el porcentaje total de espermatozoides con movilidad progresiva (Figura 37A). A concentraciones más altas (10 μM), la kisspeptina produjo una rápida estimulación de la movilidad progresiva aumentando tanto la movilidad tipo a como la movilidad tipo b, provocando de esta manera un aumento neto del porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva. Este hecho se observó

a los 2 y a los 15 minutos tras la adición del péptido. Sin embargo, a los 30 minutos se observó un claro descenso en la movilidad progresiva total de las muestras. Finalmente, a tiempos más largos de exposición a la kisspeptina 10 μM (60-120 minutos), se produjo una nueva fase de estimulación de la movilidad progresiva (Figura 37B). Todos estos efectos fueron abolidos en presencia del antagonista específico del receptor KISS1R p234 (0,3 μM) (Figura 37C). Estas medidas se realizaron mediante el sistema de análisis computerizado de la movilidad espermática CASA.

Las respuestas descritas para la kisspeptina no se observaron en todas las muestras ensayadas. Así, los efectos de la kisspeptina 1 μM aparecieron en cuatro de los cinco experimentos y los efectos de la kisspeptina 10 μM se observaron en cinco de las siete muestras analizadas en ausencia del antagonista p234 y en ocho de las catorce muestras donde se realizaron las experiencias en presencia del citado antagonista.

En relación a los parámetros cinéticos que definen los cambios en la movilidad progresiva inducidos por la kisspeptina (10 μM) en los espermatozoides, pudimos observar que se producía un aumento en todos los índices de velocidad (VCL, VSL y VAP) a los tiempos 2 y 15 minutos, seguido de un descenso a los 30 minutos en VSL y VAP y no en VCL. Finalmente, se produjo un incremento de estos parámetros a los 60 minutos (Figura 38). Respecto a los índices de trayectoria de los espermatozoides, la kisspeptina produjo un descenso de LIN y STR a los 2 y 15 minutos, aunque el efecto fue estadísticamente significativo únicamente para LIN. Ambos índices experimentaron una progresiva recuperación a medida que aumentaba el tiempo de exposición a la kisspeptina hasta llegar a valores por encima de los del solvente, observándose un aumento estadísticamente significativo en el parámetro LIN a los 120 minutos. En el caso del parámetro WOB, se observó un aumento del mismo a todos los tiempos analizados, y las diferencias respecto al solvente fueron estadísticamente significativas a los 2, 30 y 120 minutos (Figura 39). Por último, tanto la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides (ALH) como la frecuencia de batido flagelar (BCF) experimentaron un claro aumento tras la adición de la kisspeptina. Este hecho solo fue estadísticamente significativo a los tiempos 2 y 15 minutos para ALH y a todos los tiempos, excepto a los 120 minutos, para BCF (Figura 40).

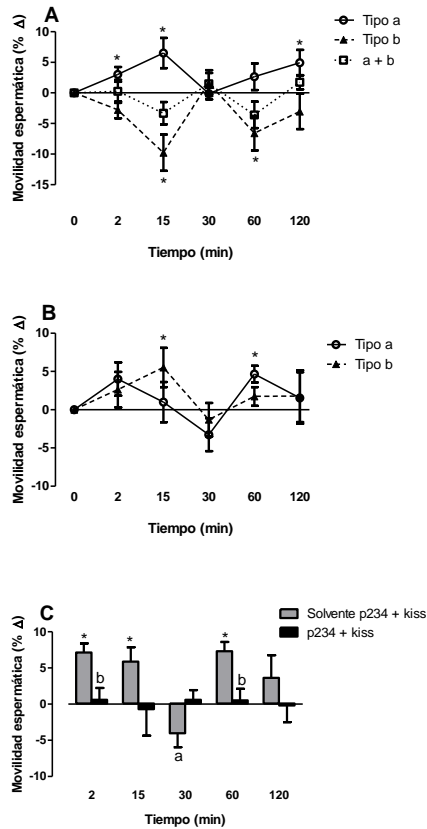


Figura 37: Efectos de la kisspeptina sobre la movilidad espermática humana a diferentes tiempos de incubación. **(A)** Efecto de la kisspeptina (1 μM) sobre la movilidad progresiva rápida (tipo *a*), la movilidad progresiva lenta (tipo *b*) y la movilidad progresiva total (*a* + *b*) ($n=4$). **(B)** Efecto de la kisspeptina (10 μM) sobre la movilidad progresiva rápida (tipo *a*) y la movilidad progresiva lenta (tipo *b*) ($n=5$). **(C)** Efectos de la kisspeptina (10 μM) sobre la movilidad progresiva total (*a* + *b*) en presencia del antagonista selectivo de KISS1R p234 (0,3 μM) o su solvente ($n=8$). Los resultados fueron normalizados mediante la fórmula (tratamiento-control) para cada uno de los tiempos estudiados. Los valores representados son medias \pm SEM. * $P<0,05$, diferencia significativa respecto al tiempo=0, test de Kruskal-Wallis. ^a $P<0,05$, diferencia significativa respecto a las respuestas de la kisspeptina a los tiempos 2, 15 y 60, test de Kruskal-Wallis. ^b $P<0,05$, diferencia significativa respecto a la respuesta de la kisspeptina en presencia del solvente de p234, test U de Mann-Whitney.

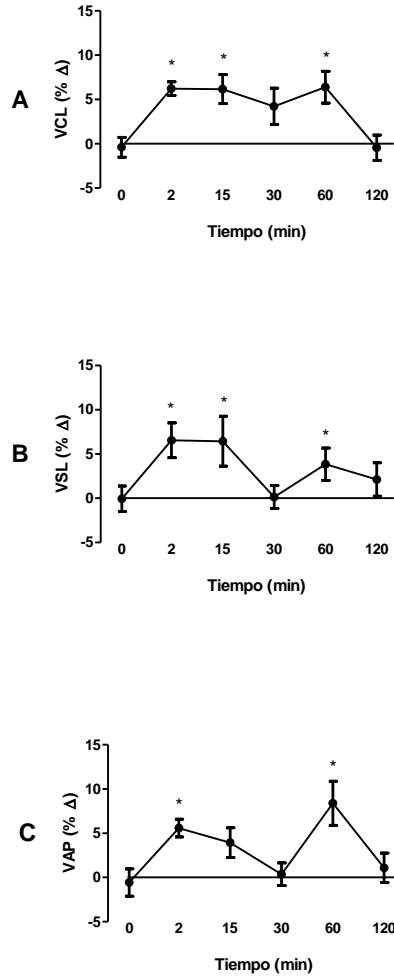


Figura 38: Efecto de la kisspeptina (10 μ M) sobre los parámetros de velocidad de la movilidad espermática tras diversos tiempos de incubación. **(A)** Efecto de la kisspeptina sobre la velocidad curvilínea VCL (n=9) **(B)** Efecto de la kisspeptina sobre la velocidad rectilínea VSL (n=9) **(C)** Efecto de la kisspeptina sobre la velocidad promedio VAP (n=9). Los resultados fueron normalizados mediante la fórmula (tratamiento-control)/control*100. Los valores representados son medias \pm SEM. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto al control tratado con solvente al tiempo correspondiente.

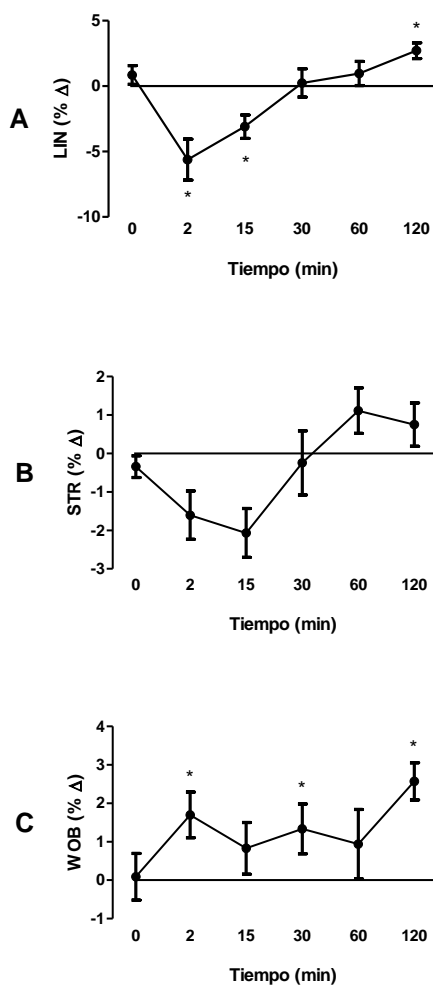


Figura 39: Efecto de la kisspeptina (10 μ M) sobre los índices de trayectoria de la movilidad espermática tras diversos tiempos de incubación. **(A)** Efecto de la kisspeptina sobre el índice de linealidad LIN (n=9) **(B)** Efecto de la kisspeptina sobre el índice de rectitud STR (n=9) **(C)** Efecto de la kisspeptina sobre el índice de oscilación WOB (n=9). Los resultados fueron normalizados mediante la fórmula (tratamiento-control)/control*100. Los valores representados son medias \pm SEM. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto al control tratado con solvente al tiempo correspondiente.

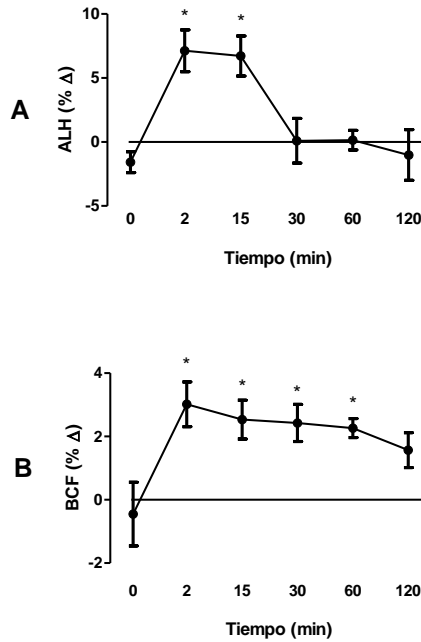


Figura 40: Efecto de la kisspeptina (10 μM) sobre los parámetros **(A)** amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, ALH (n=9) y **(B)** frecuencia de batido flagelar, BCF (n=9) tras diversos tiempos de incubación. Los resultados fueron normalizados mediante la fórmula (tratamiento-control)/control*100. Los valores representados son medias ± SEM. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto al control tratado con solvente al tiempo correspondiente.

4. EFECTOS DE LA SUSTANCIA P Y LA KISSPEPTINA SOBRE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

4.1. EFECTOS DE LA SUSTANCIA P Y LA KISSPEPTINA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE Na^+ INTRACELULAR, $[\text{Na}^+]_i$

Investigamos los posibles efectos que pudieran tener tanto las TKs como la kisspeptina sobre la movilización de Na^+ intracelular en los espermatozoides humanos. Para ello marcamos determinadas alícuotas de espermatozoides con la sonda fluorescente SBFI específica de Na^+ y añadimos SP (1 μM), kisspeptina (10 μM) o el correspondiente solvente. Estas experiencias se realizaron con la SP por ser la TK que produjo un mayor incremento de movilidad progresiva en los experimentos de movilidad.

La SP (1 μM , Figura 41A) y la kisspeptina (10 μM , Figura 41B), a las concentraciones ensayadas, no produjeron ningún cambio en la concentración intracelular de Na^+ en espermatozoides resuspendidos en mHTF. Como control positivo, en cada alícuota ensayada se añadió, tras el péptido en estudio, EGTA 4 mM, el cual provocó un rápido aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ alcanzándose una meseta que se mantuvo durante el tiempo de contacto del EGTA con los espermatozoides (Figura 41).

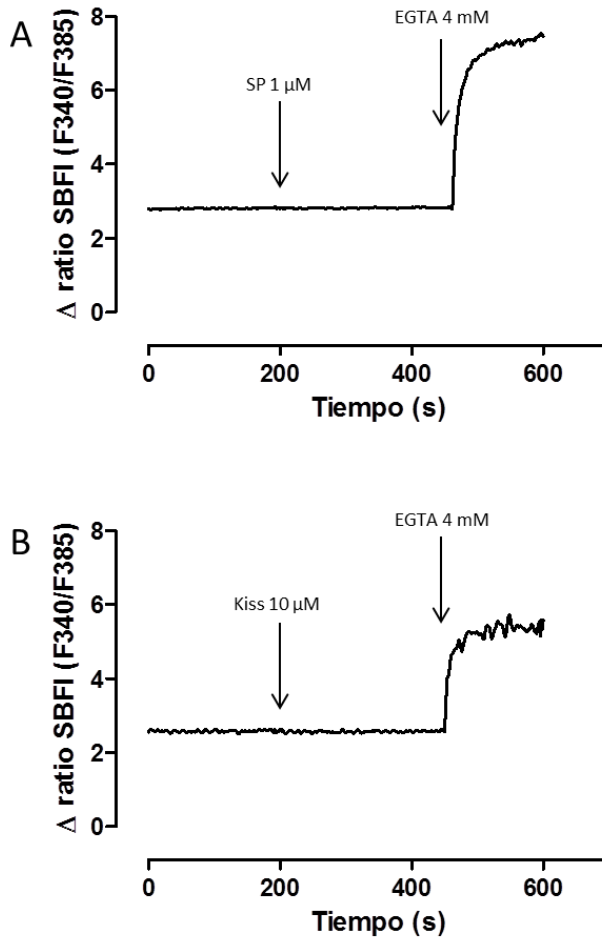


Figura 41: Efecto de la SP (1 μM) y de la kisspeptina (10 μM) sobre los niveles de Na^+ intracelular en los espermatozoides humanos. **(A)** Efecto de la SP (1 μM) sobre la $[\text{Na}^+]_i$ (n=6) **(B)** Efecto de la kisspeptina (10 μM) sobre la $[\text{Na}^+]_i$ (n=4). El eje X muestra el tiempo expresado en segundos y el eje Y la $[\text{Na}^+]_i$ expresada como la ratio F340/F385.

4.2. EFECTOS DE LA SUSTANCIA P Y LA KISSPEPTINA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR, $[\text{Ca}^{2+}]_i$

En estos experimentos analizamos los efectos de la SP y la kisspeptina en espermatozoides marcados con la sonda específica de Ca^{2+} Fura-2. En el caso de la SP (1 μM) no observamos ningún cambio en los niveles de Ca^{2+} libre, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en el citoplasma celular (Figura 42A).

Sin embargo, la kisspeptina sí indujo una movilización de Ca^{2+} y un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a las concentraciones de 1 μM , 10 μM y 20 μM . Todas estas concentraciones provocaron un incremento progresivo y suavemente sostenido hasta alcanzar una meseta entre los 3 y 6 minutos tras la adición de la kisspeptina (Figura 42B). Esta respuesta se observó en tres de las ocho suspensiones de espermatozoides a las que se le añadió kisspeptina 1 μM , en cinco de las nueve a las que se le añadió kisspeptina 10 μM y en ocho de las nueve a las que se le añadió 20 μM . La concentración basal de Ca^{2+} en ausencia de kisspeptina fue de $104 \pm 2 \text{ nM}$ ($n=16$). En la fase de meseta, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pasó a ser de $108 \pm 3 \text{ nM}$ ($n=3$, $P>0,05$), $114 \pm 4 \text{ nM}$ ($n=5$, $P<0,01$) y $124 \pm 8 \text{ nM}$ ($n=8$, $P<0,01$) en presencia de kisspeptina 1 μM , 10 μM y 20 μM respectivamente.

Al final de la experiencia tanto en los experimentos con SP como con kisspeptina utilizamos como control positivo la progesterona (1 μM) añadida a la suspensión de espermatozoides tras la adición de los péptidos o sus solventes. En todas las alícuotas estudiadas, la progesterona produjo la típica respuesta bifásica ampliamente documentada en espermatozoides y consistente en un pico transitorio de aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seguido de un descenso que desemboca en una fase de meseta sostenida durante el tiempo de estimulación de los espermatozoides con la progesterona. Aparentemente, la respuesta del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a la progesterona fue idéntica cuando se añadió tras la SP o la kisspeptina o sus correspondientes solventes.

Con el fin de analizar con mayor profundidad los efectos de la SP sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$, estudiamos los efectos de esta TK sobre la movilización del Ca^{2+} en célula aislada marcada con Oregon Green (Figura 43). Volvimos a comprobar que no se producían modificaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la exposición de los espermatozoides a SP (1 μM). Por el contrario, sí se observaron cambios en la intensidad de la

señal emitida por los espermatozoides expuestos a progesterona ($1 \mu\text{M}$) debido a la entrada de Ca^{2+} al interior del citoplasma espermático (Figura 43).

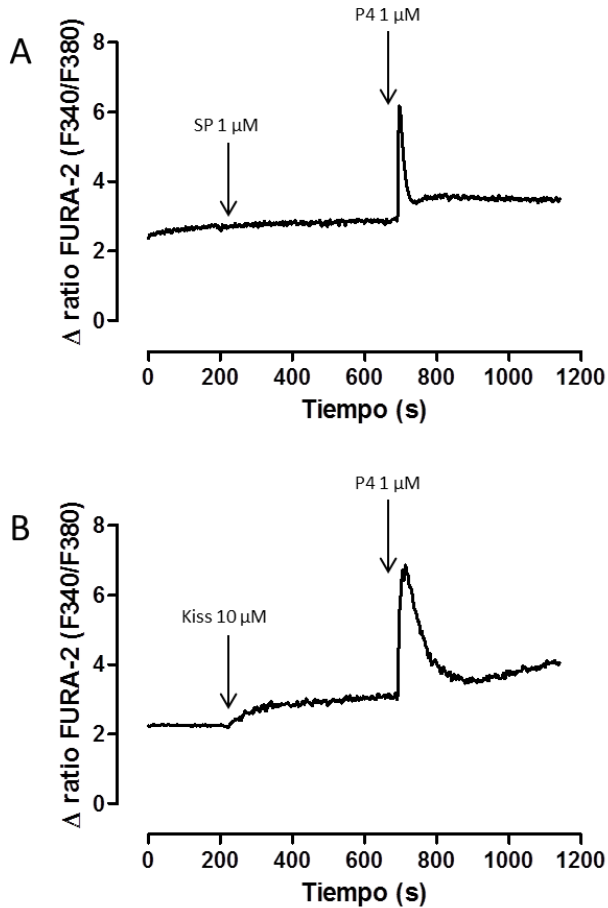


Figura 42: Efecto de la SP ($1 \mu\text{M}$) y de la kisspeptina ($10 \mu\text{M}$) sobre los niveles de Ca^{2+} libre intracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en espermatozoides humanos analizados por espectrofluorimetría tras el marcaje con la sonda específica de Ca^{2+} Fura-2. **(A)** Efecto de la SP ($1 \mu\text{M}$) sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($n=8$) **(B)** Efecto de la kisspeptina ($10 \mu\text{M}$) sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($n=6$). La figura muestra también la respuesta inducida por la progesterona (P4, $1 \mu\text{M}$), añadida como control positivo al final de cada experiencia. El eje X muestra el tiempo expresado en segundos y el eje Y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ expresada como la ratio F340/F380.

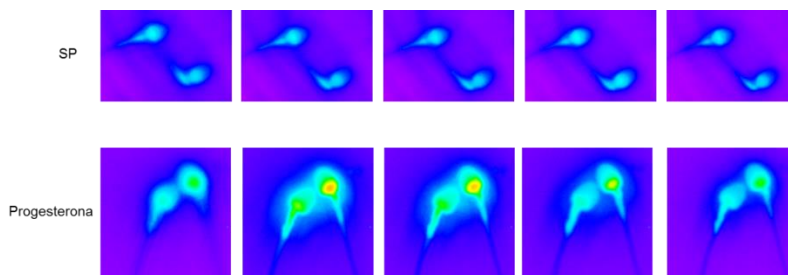


Figura 43: Efecto de la SP (1 μM) y de la progesterona (1 μM) sobre los niveles de Ca^{2+} libre intracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en los espermatozoides humanos aislados utilizando la sonda Oregon Green. Imágenes consecutivas de falso color obtenidas en el microscopio de fluorescencia tras la adición de SP o de progesterona.

4.3. EFECTOS DE LA SUSTANCIA P Y LA KISSPEPTINA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE TIROSINA

La capacitación espermática está íntimamente relacionada con el aumento progresivo de residuos de tirosina fosforilados, localizados fundamentalmente en la pieza principal del flagelo. Gracias a este hecho y mediante el empleo de un anticuerpo primario específico, marcado con FITC y capaz de reconocer la fosforilación del aminoácido tirosina, PY, pudimos cuantificar si la exposición de los espermatozoides a SP (1 μM o 100 nM) o a kisspeptina (10 μM) aumentaba dichos niveles bajo condiciones capacitantes (37°C, 5% CO_2 en presencia de HCO_3^- y albúmina en el medio). Los resultados fueron analizados mediante citometría de flujo. En primer lugar demostramos que la técnica era efectiva para el análisis de la fosforilación de residuos de tirosina y, por tanto, para el estudio de la capacitación espermática. Para ello, incubamos los espermatozoides en condiciones capacitantes durante diferentes tiempos y analizamos los niveles de PY mediante citometría de flujo. La Figura 44 muestra el incremento de los residuos de tirosina fosforilados en los espermatozoides con el tiempo de capacitación, alcanzándose valores significativos a partir de los 60 minutos de incubación.

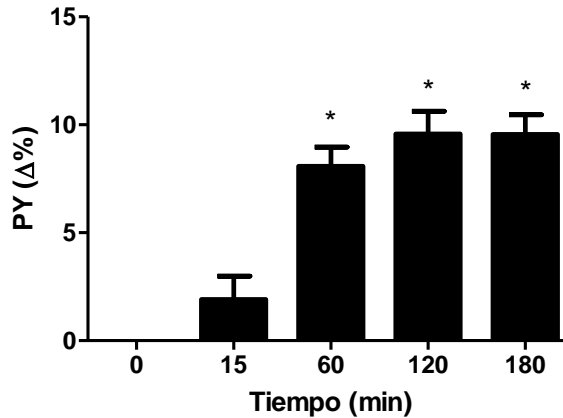


Figura 44: Efecto del tiempo de incubación de espermatozoides en condiciones capacitantes (37°C, 5% CO₂, en presencia de HCO₃⁻ y albúmina) sobre los niveles de fosforilación de residuos de tirosina, PY (n=24). Los resultados se determinaron mediante citometría de flujo y se normalizaron mediante la fórmula: valor a tiempo X - valor a tiempo 0. Los datos representados son medias ± SEM. *P<0,05, diferencia significativa respecto al tiempo=0.

La SP, tanto a 100 nM como a 1 μM provocó una aceleración de la capacitación, observándose un aumento de los niveles de PY inducidos mediante la incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes en comparación con las alícuotas tratadas con el solvente a los mismos tiempos (Figura 45A y 45B). La menor de las dos concentraciones ensayadas produjo cambios a los 15 y a los 180 minutos, mientras que la mayor de las concentraciones empleadas provocó cambios significativos a todos los tiempos en los que se llevó a cabo el marcaje. Del mismo modo, cuando los espermatozoides fueron preincubados durante 15 minutos con el cocktail de antagonistas selectivos de los tres receptores taquicinérgicos (SR140333 100 nM, SR48968 100 nM, SB222200 1 μM) antes de ser sometidos a condiciones capacitantes y expuestos a SP 1 μM, los niveles de capacitación de las muestras fueron menores en todos los tiempos, siendo los valores estadísticamente significativos a los 15 y a los 60 minutos, poniéndose nuevamente de manifiesto que la acción de la SP en los espermatozoides está mediada a través de sus receptores específicos (Figura 45C).

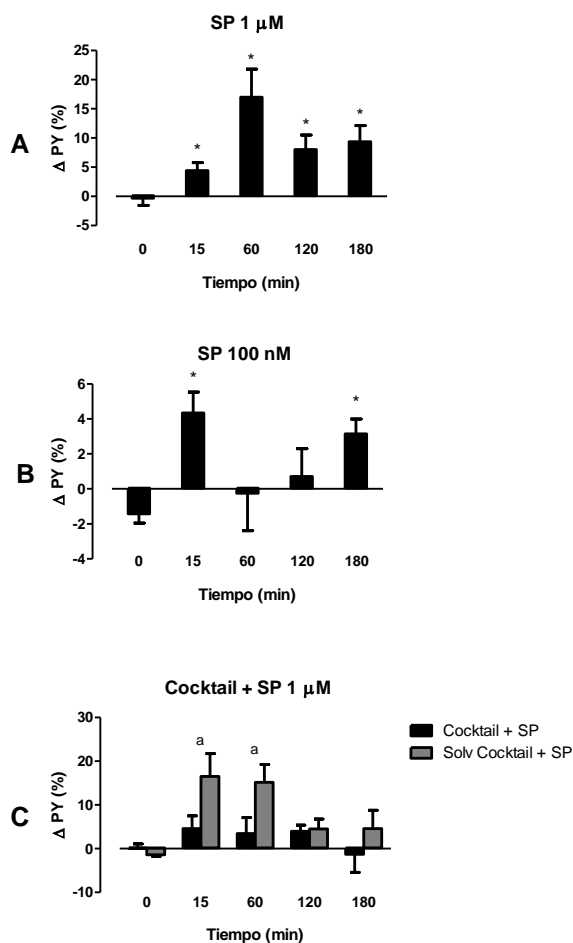


Figura 45: Efecto de la SP (1 μ M - 100 nM) sobre los niveles de fosforilación de residuos de tirosina, PY, a diversos tiempos de incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes (37°C, 5% CO₂, en presencia de HCO₃⁻ y albúmina). Los resultados fueron obtenidos mediante citometría de flujo. **(A)** Efecto de la SP (1 μ M) (n=14) **(B)** Efecto de la SP (100 nM) (n=14). **(C)** Efecto de la SP (1 μ M) en presencia de un cocktail de antagonistas selectivos de los receptores taquicinérgicos (SR140333 100 nM, SR48968 100 nM, SB222200 1 μ M) o su solvente (n=12). Los resultados fueron normalizados mediante la fórmula (tratamiento-control)/control*100. Los valores representados son medias \pm SEM. * P <0,05, diferencia significativa respecto al tiempo=0. ^a P <0,05, diferencia significativa respecto al control tratado con solvente durante el tiempo correspondiente.

Cuando analizamos el posible efecto de la kisspeptina (10 μ M) sobre los niveles de fosforilación de tirosinas, los resultados obtenidos fueron completamente distintos (Figura 46). Así, la kisspeptina no indujo variación en los niveles de PY a ninguno de los tiempos estudiados (15, 60, 120 y 180 minutos).

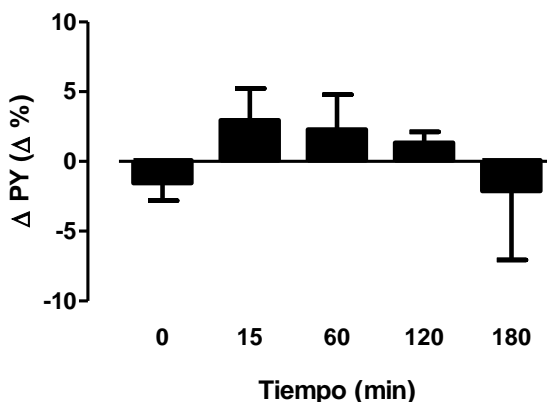


Figura 46: Efecto de la kisspeptina (10 μ M) sobre los niveles de fosforilación de residuos de tirosina, PY, a diversos tiempos de incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes (37°C, 5% CO₂, en presencia de HCO₃⁻ y albúmina) (n=12). Los resultados fueron obtenidos mediante citometría de flujo. Los resultados fueron normalizados mediante la fórmula (tratamiento-control)/control*100. Los valores representados son medias \pm SEM.

Una vez demostrado el aumento de los niveles de PY que provoca la SP, procedimos a analizar este hecho mediante Western blot. Al igual que en el estudio previo de citometría de flujo, el análisis por densitometría de las señales obtenidas por Western blot con el anticuerpo específico de PY bajo condiciones capacitantes puso de manifiesto un aumento temporal de las mismas (Figura 47).

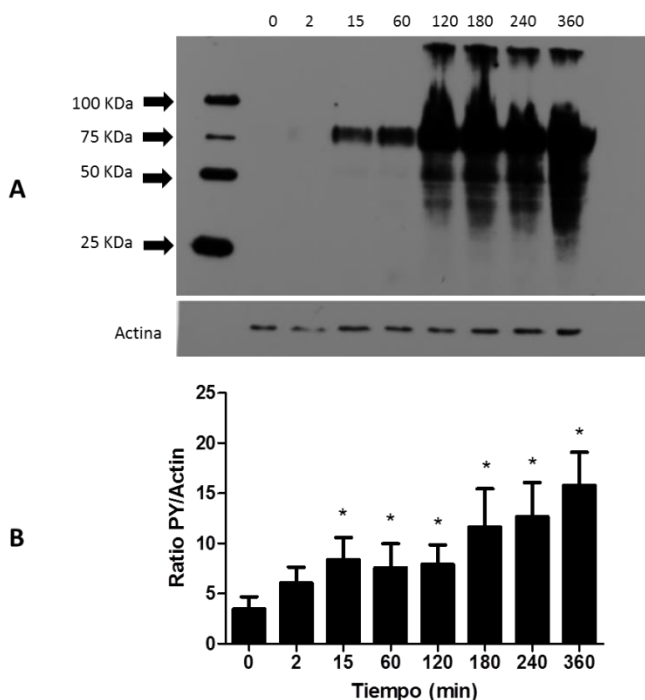


Figura 47: Efecto de la incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes (37°C, 5% CO₂, en presencia de HCO₃⁻ y albúmina) sobre los niveles de fosforilación de proteínas en los residuos de tirosina, PY, a diversos tiempos (n=8). Los resultados fueron obtenidos mediante Western blot. **(A)** Western blot representativo obtenido en una muestra espermática incubada a diferentes tiempos. En la parte inferior, se muestra la señal obtenida a cada tiempo para la proteína actina, utilizada como control interno. **(B)** Datos de la ratio PY/Actina para cada tiempo ensayado. Los resultados fueron normalizados respecto a la densitometría de la actina. Los valores representados son medias \pm SEM. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto al tiempo=0.

Sin embargo, los resultados obtenidos cuando los espermatozoides fueron incubados con SP 1 μ M no permitieron identificar si esta TK induce la fosforilación de alguna proteína específica o del total de proteínas que sufren fosforilaciones en residuos de tirosina, incluso cuando las experiencias se realizaron en presencia de fosforamidón 1 μ M para potenciar su posible efecto mediante la inhibición de la NEP (Figura 48).

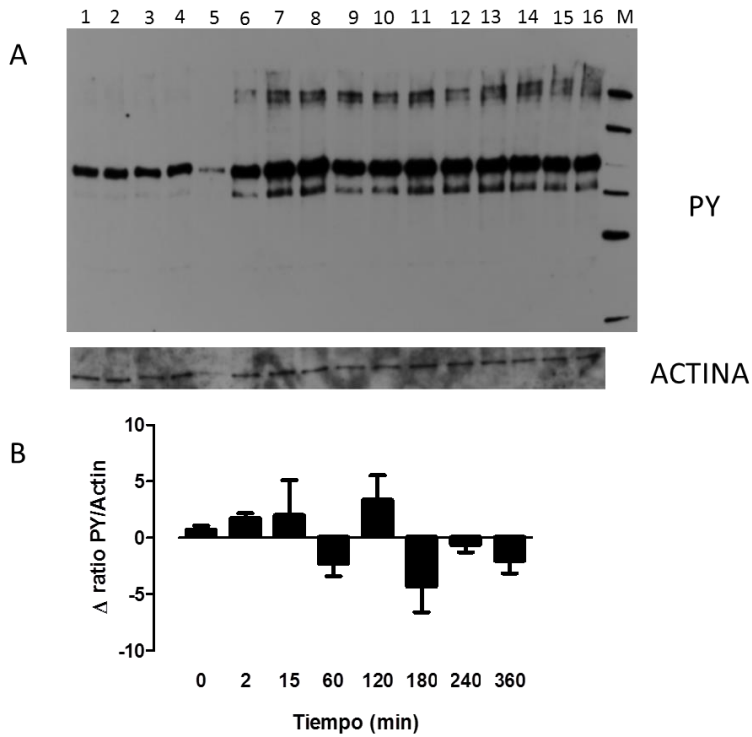


Figura 48: Efectos de la incubación de los espermatozoides con SP (1 μ M) en presencia de fosforamidón (F) (1 μ M) y en condiciones capacitantes (37°C, 5% CO₂, en presencia de HCO₃⁻ y albúmina) sobre los niveles de fosforilación de proteínas en los residuos de tirosina, PY, a diversos tiempos (n=8). **(A)** Western blot representativo obtenido en una muestra espermática incubada con SP (1 μ M) en presencia de fosforamidón (1 μ M) o el correspondiente solvente (S) a diferentes tiempos. En la parte inferior, se muestra la señal obtenida a cada tiempo para la proteína actina, utilizada como control interno. Calle 1: F+SP 0'; calle 2: S+S 0'; calle 3: F+SP 2'; calle 4: S+S 2'; calle 5: F+SP 15'; calle 6: S+S 15'; calle 7: F+SP 60'; calle 8: S+S 60'; calle 9: F+SP 120'; calle 10: S+S 120'; calle 11: F+SP 180'; calle 12: S+S 180'; calle 13: F+SP 240'; calle 14: S+S 240'; calle 15: F+SP 360'; calle 16: S+S 360'; M: Marcador de pesos moleculares. **(B)** Datos del incremento de la ratio PY/Actina entre tratamiento y solvente para cada tiempo ensayado. Los resultados fueron normalizados respecto a la densitometría de la actina y calculados mediante la fórmula: (densitometría PY en tratamiento/densitometría actina) - (densitometría PY en solvente/densitometría actina). Los valores representados son medias \pm SEM.

4.4. EFECTOS DE LA SUSTANCIA P SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE SERINA/TREONINA A TRAVÉS DE LAS RUTAS DE PKA Y PKC

La capacitación espermática también se caracteriza por la activación de las quinasas de serina y treonina PKA y PKC. Mediante Western blot y con anticuerpos primarios específicos contra los residuos de serina y treonina fosforilados, decidimos estudiar si la SP (1 μ M) en presencia de fosforamidón (1 μ M) era capaz de aumentar los niveles de fosforilación en serina y treonina de determinadas proteínas específicas tras activación de la PKA o la PKC en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes (37°C, 5% CO₂ en presencia de HCO₃⁻ y albúmina en el medio). En primer lugar pusimos de manifiesto que, en nuestras condiciones experimentales, se producía un aumento en la fosforilación de residuos de serina y treonina en proteínas de las rutas de la PKA (Figura 49) y la PKC (Figura 50) que era dependiente de tiempo de incubación en condiciones capacitantes.

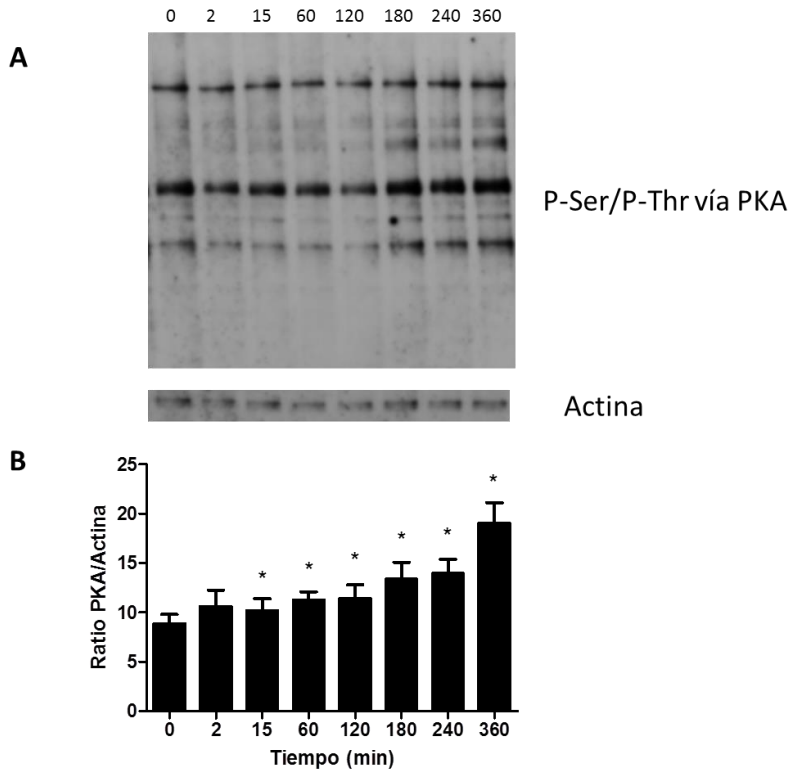


Figura 49: Efecto de la incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes (37°C, 5% CO₂, en presencia de HCO₃⁻ y albúmina) sobre los niveles de fosforilación de proteínas en los residuos de serina y treonina, P-Ser y P-Thr, tras activación de la vía de la PKA a diversos tiempos (n=8). Los resultados fueron obtenidos mediante Western blot. **(A)** Western blot representativo obtenido en una muestra espermática incubada a diferentes tiempos. En la parte inferior, se muestra la señal obtenida a cada tiempo para la proteína actina, utilizada como control interno. **(B)** Datos de la ratio (P-Ser/P-Thr)/Actina para cada tiempo ensayado. Los resultados fueron normalizados respecto a la densitometría de la actina. Los valores representados son medias \pm SEM. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto al tiempo=0.

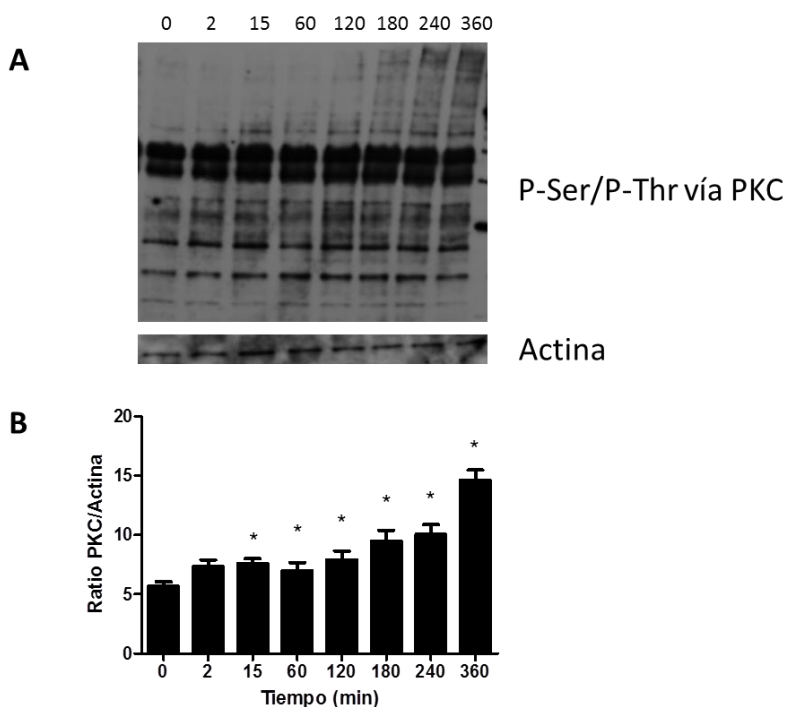


Figura 50: Efecto de la incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes (37°C, 5% CO₂, en presencia de HCO₃⁻ y albúmina) sobre los niveles de fosforilación de proteínas en los residuos de serina y treonina, P-Ser y P-Thr, tras activación de la vía de la PKC a diversos tiempos (n=8). Los resultados fueron obtenidos mediante Western blot. **(A)** Western blot representativo obtenido en una muestra espermática incubada a diferentes tiempos. En la parte inferior, se muestra la señal obtenida a cada tiempo para la proteína actina, utilizada como control interno. **(B)** Datos de la ratio (P-Ser/P-Thr)/Actina para cada tiempo ensayado. Los resultados fueron normalizados respecto a la densitometría de la actina. Los valores representados son medias \pm SEM. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto al tiempo=0.

En nuestros experimentos, fuimos incapaces de determinar si la SP alteraba los niveles de fosforilación de las proteínas específicas de las vías de la PKA o la PKC a ninguno de los tiempos estudiados (Figura 51 para vías activadas por PKA y Figura 52 para vías activadas por PKC).

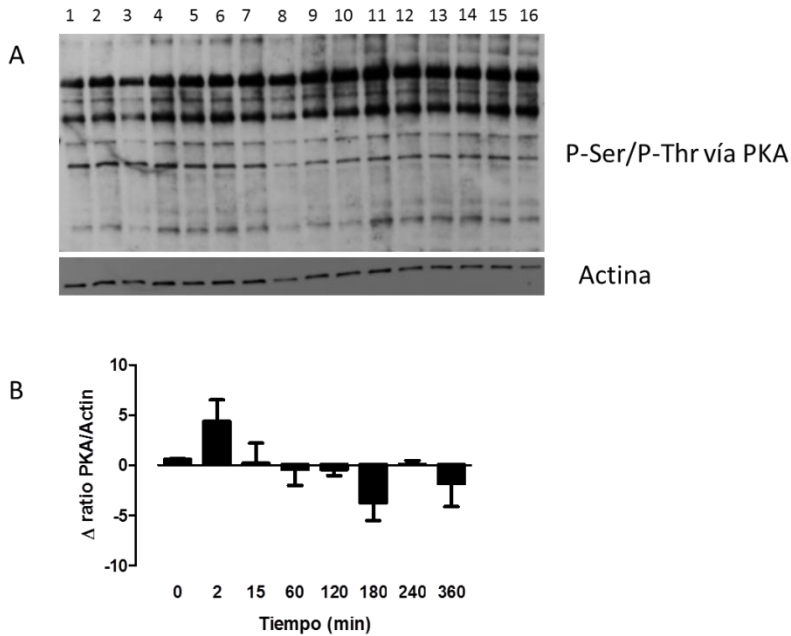


Figura 51: Efectos de la incubación de los espermatozoides con SP (1 μ M) en presencia de fosforamidon (F) (1 μ M) y en condiciones capacitantes (37°C, 5% CO₂, en presencia de HCO₃⁻ y albúmina) sobre los niveles de fosforilación de proteínas en los residuos de serina y treonina, P-Ser y P-Thr, tras activación de la vía de la PKA a diversos tiempos (n=8). **(A)** Western blot representativo obtenido en una muestra espermática incubada con SP (1 μ M) en presencia de fosforamidon (1 μ M) o el correspondiente solvente (S) a diferentes tiempos. En la parte inferior, se muestra la señal obtenida a cada tiempo para la proteína actina, utilizada como control interno. Calle 1: F+SP 0'; calle 2: S+S 0'; calle 3: F+SP 2'; calle 4: S+S 2'; calle 5: F+SP 15'; calle 6: S+S 15'; calle 7: F+SP 60'; calle 8: S+S 60'; calle 9: F+SP 120'; calle 10: S+S 120'; calle 11: F+SP 180'; calle 12: S+S 180'; calle 13: F+SP 240'; calle 14: S+S 240'; calle 15: F+SP 360'; calle 16: S+S 360'. **(B)** Datos del incremento de la ratio (P-Ser/P-Thr)/Actina entre tratamiento y solvente para cada tiempo ensayado. Los resultados fueron normalizados respecto a la densitometría de la actina y calculados a cada tiempo mediante la fórmula: (densitometría P-Ser/P-Thr en tratamiento/densitometría actina) - (densitometría P-Ser/P-Thr en solvente/densitometría actina). Los valores representados son medias \pm SEM.

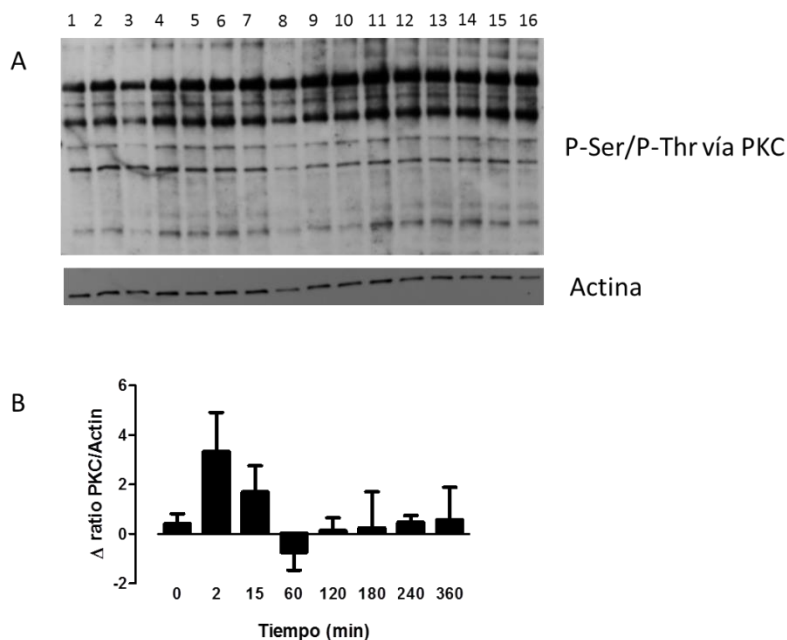


Figura 52: Efectos de la incubación de los espermatozoides con SP (1 μ M) en presencia de fosforamidón (F) (1 μ M) en condiciones capacitantes (37°C, 5% CO₂, en presencia de HCO₃⁻ y albúmina) sobre los niveles de fosforilación de proteínas en los residuos de serina y treonina, P-Ser y P-Thr, tras activación de la vía de la PKC a diversos tiempos (n=8). **(A)** Western blot representativo obtenido en una muestra espermática incubada con SP (1 μ M) en presencia de fosforamidón (1 μ M) o el correspondiente solvente (S) a diferentes tiempos. En la parte inferior, se muestra la señal obtenida a cada tiempo para la proteína actina, utilizada como control interno. Calle 1: F+SP 0'; calle 2: S+S 0'; calle 3: F+SP 2'; calle 4: S+S 2'; calle 5: F+SP 15'; calle 6: S+S 15'; calle 7: F+SP 60'; calle 8: S+S 60'; calle 9: F+SP 120'; calle 10: S+S 120'; calle 11: F+SP 180'; calle 12: S+S 180'; calle 13: F+SP 240'; calle 14: S+S 240'; calle 15: F+SP 360'; calle 16: S+S 360'. **(B)** Datos del incremento del ratio (P-Ser/P-Thr)/Actina entre tratamiento y solvente para cada tiempo ensayado. Los resultados fueron normalizados respecto a la densitometría de la actina y calculados a cada tiempo mediante la fórmula: (densitometría P-Ser/P-Thr en tratamiento/densitometría actina) - (densitometría P-Ser/P-Thr en solvente/densitometría actina). Los valores representados son medias \pm SEM.

5. PAPEL DE LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS EN LA QUIMIOTAXIS INDUCIDA EN LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR EL FLUIDO FOLICULAR

Utilizando la cámara descrita en el apartado de Metodología, comprobamos que el FF ejerce un efecto quimioatrayente sobre los espermatozoides. Observamos que el efecto quimioatrayente era menor en presencia de un cocktail de antagonistas de los tres receptores taquicinérgicos, sobre todo en los primeros tiempos en los que se realizó el análisis (10, 20 y 30 minutos aunque también fue estadísticamente significativo a los 50 minutos) (Figura 53).

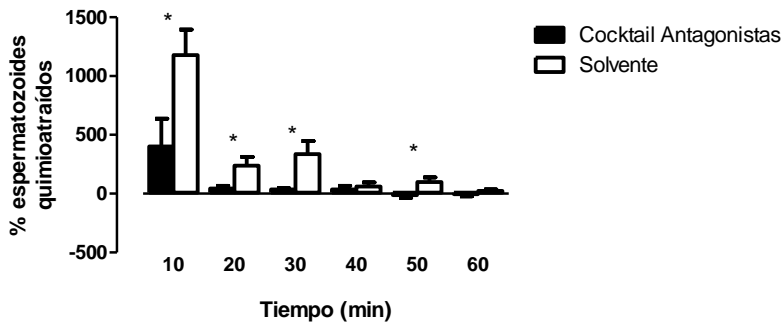


Figura 53: Efecto de los antagonistas de los receptores taquicinérgicos (SR140333 100 nM, SR48968 100 nM, SB222200 1 μ M, 45 minutos) sobre el efecto quimioatrayente del líquido folicular en espermatozoides tras diferentes tiempos de exposición al mismo (n=7). El número de espermatozoides encontrados en cada brazo en cada tiempo se obtuvo de la media de los espermatozoides hallados en cada alícuota que se extrajo. Para cada tiempo y tratamiento, los resultados fueron normalizados mediante la fórmula para cada tiempo y tratamiento: (número de espermatozoides en líquido folicular/número de espermatozoides en medio de cultivo)*100. Los valores han sido representados como medias \pm SEM. * $P < 0,05$, diferencia significativa entre ambos tratamientos para cada tiempo.

6. EFECTOS DE LA SUSTANCIA P Y LA KISSPEPTINA SOBRE LA HIPERACTIVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS

En estas experiencias, analizamos si el aumento de movilidad progresiva que producían tanto la SP como la kisspeptina iba asociada a un aumento de la movilidad hiperactiva de los espermatozoides. Ayudándonos del sistema CASA definimos que un espermatozoide mostraba movilidad hiperactiva cuando presentaba una VCL > 150 $\mu\text{m/s}$, una LIN < 50% y una ALH > 7 μm . En el caso de la SP (1 μM) no se observó ningún efecto sobre la hiperactivación de los espermatozoides a ninguno de los tiempos ensayados ($n=15$, Figura 54A). Sin embargo, en el caso de la kisspeptina (10 μM) sí se observó un aumento de la movilidad hiperactiva en 9 de los 14 experimentos realizados. De esas 9 muestras, 5 presentaron hiperactivación a los 2 minutos, las 9 a los 15 minutos, 7 permanecían hiperactivas a los 30 minutos y 4 mantenían una hiperactivación residual a los 60 minutos. Ninguna muestra mantuvo el aumento de movilidad hiperactiva a los 120 minutos del comienzo de la exposición al péptido. Del mismo modo, observamos que el antagonista del receptor del KISS1R p234 (0,3 μM) inhibía parte de esta hiperactivación a todos los tiempos ensayados aunque el efecto solo fue estadísticamente significativo a los 30 minutos (Figura 54B).

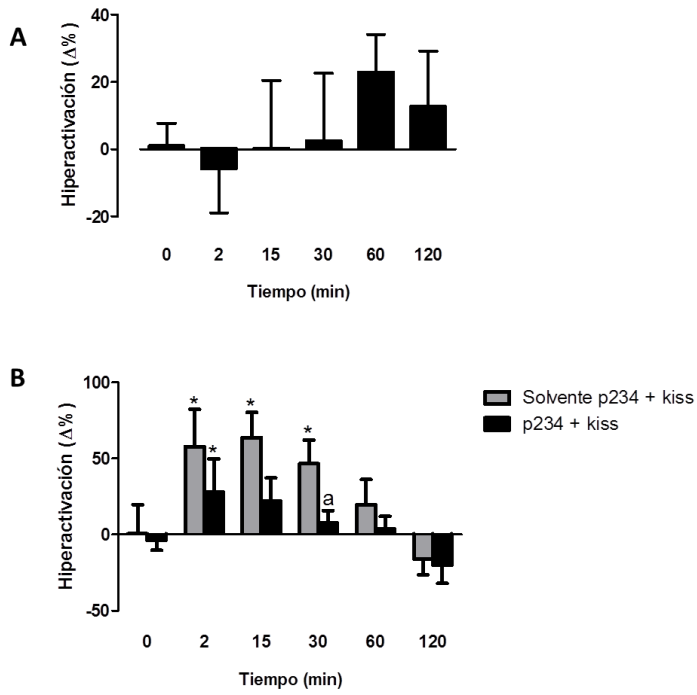


Figura 54: Efecto de la SP (1 μM) y la kisspeptina (10 μM) sobre la movilidad hiperactiva de los espermatozoides. **(A)** Efecto de la SP (1 μM) sobre la hiperactivación de los espermatozoides ($n=15$). **(B)** Efecto de la kisspeptina (10 μM) sobre la hiperactivación de los espermatozoides en espermatozoides preincubados durante 15 minutos con el antagonista selectivo de KISS1R p234 (0,3 μM) o su solvente ($n=14$). Los resultados fueron normalizados mediante la fórmula $(\text{tratamiento-control})/\text{control} \times 100$. Los valores representados son medias \pm SEM. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto al solvente para cada tiempo. ^a $P < 0,05$, diferencia significativa entre la alícuota tratada con p234 y la que fue expuesta solo a su solvente.

7. EFECTOS DE LA SUSTANCIA P Y LA KISSPEPTINA SOBRE LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Para estudiar si la SP (1 μM) o la kisspeptina (10 μM) eran capaces de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides capacitados tras 6 horas en el incubador a 37°C y 5% CO₂ utilizamos la tinción de FITC-PSA. Los resultados demostraron que ni la SP ni la kisspeptina inducían la reacción acrosómica en los espermatozoides capacitados ya que ninguno de los péptidos aumentó los niveles de reacción acrosómica respecto al valor inicial, mientras que el ionóforo A23187, empleado para conocer el máximo de reacción acrosómica en cada muestra, sí produjo una diferencia significativa respecto al estatus acrosómico inicial (Figura 55).

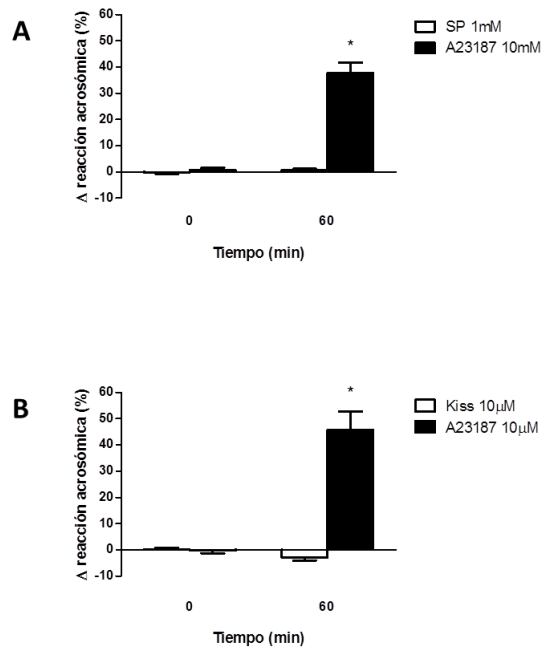


Figura 55: Efecto de la SP (1 μ M), la kisspeptina (10 μ M) y el ionóforo A23187 (10 μ M) sobre la reacción acrosómica en espermatozoides humanos tras su capacitación durante 6 horas. **(A)** Efecto de la incubación con SP (1 μ M) durante 60 minutos sobre la reacción acrosómica espermática (n=10). **(B)** Efecto de la incubación con kisspeptina (10 μ M) durante 60 minutos sobre la reacción acrosómica espermática (n=8). Las medidas se realizaron solo en espermatozoides vivos utilizando la tinción FITC-PSA. Los resultados fueron normalizados mediante la fórmula (tratamiento-solvente). Los valores representados son medias \pm SEM. * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto al tiempo=0.

8. LOCALIZACIÓN DE LA SUSTANCIA P Y LA HEMOCININA-1 EN LOS ESPERMATOZOIDES QUE HAN SUFRIDO LA REACCIÓN ACROSÓMICA

En primer lugar, pusimos de manifiesto que la tinción de la localización de las balsas lipídicas era distinta en los espermatozoides que presentaban el acrosoma intacto de aquellos que habían hecho la reacción acrosómica. Este hecho lo pusimos de manifiesto realizando la tinción de estas balsas con CTB unida a Alexa Fluor-594 conjuntamente con la tinción de los acrosomas con FITC-PSA. Los espermatozoides con señal positiva para FITC-PSA (los acrosomo-intactos) no mostraban señal para las balsas lipídicas en la región acrosomal, mientras que los espermatozoides con señal negativa para FITC-PSA (los acrosomo-reaccionados) presentaban una clara señal para las balsas lipídicas en la región acrosomal y/o en el segmento ecuatorial (Figura 56A). La técnica clásica de tinción de acrosomas del FITC-PSA y el nuevo método de tinción de los lipid rafts por CTB daban resultados similares, en términos de espermatozoides acrosomo-reaccionados, cuando la reacción acrosómica fue estudiada tanto en las alícuotas tratadas con A23187 ($56,1 \pm 5,2\%$ y $55,8 \pm 4,3\%$, respectivamente) o con su solvente ($10,9 \pm 2,5\%$ y $12,4 \pm 1,3\%$, respectivamente) (Figura 56B).

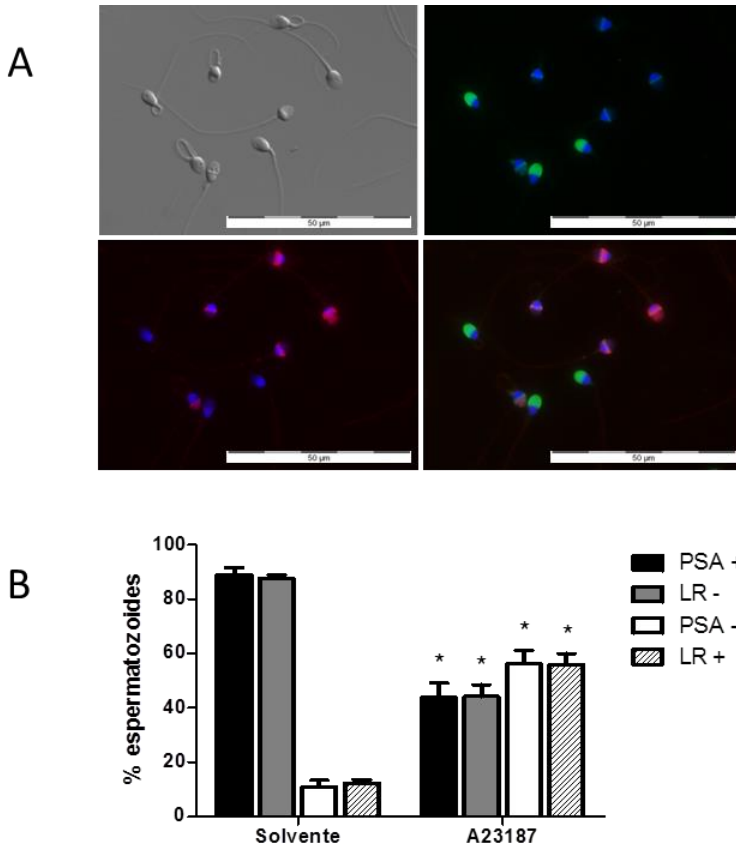


Figura 56: Estudio de la distribución de las balsas lipídicas en espermatozoides humanos previa y posteriormente a la reacción acrosómica espermática. **(A)** Análisis de la fluorescencia doble de FITC-PSA (señal verde), balsas lipídicas (señal roja) y la imagen conjunta que muestra la correspondencia entre ambas técnicas. Barra de escala = 50 μ m. **(B)** Comparación de los espermatozoides acrosomo-intactos y acrosomo-reaccionados por la técnica de FITC-PSA o la tinción de las balsas lipídicas en alícuotas tratadas con A23187 o su correspondiente solvente (n=16). * $P < 0,05$, diferencia significativa respecto a la alícuota tratada con solvente.

En otro grupo de experiencias, con el fin de analizar la posible asociación de la SP y la HK-1 con las balsas lipídicas, procedimos a realizar tinciones con CTB seguidas de análisis de inmunofluorescencia indirecta para el estudio de estas TKs que presentaban localización en la región acrosomal. Nuestros

resultados pusieron de manifiesto una estrecha correlación entre los espermatozoides que habían sufrido la reacción acrosómica, catalogados así por la presencia de balsas lipídicas de alta intensidad en su región acrosomal, y los que no mostraban señal para SP o HK-1 en dicha región. Del mismo modo, los espermatozoides que tenían el acrosoma intacto porque no mostraban señal positiva para las balsas lipídicas en su cabeza, eran los que tenían en su amplia mayoría señal positiva para ambas TKs. Este hecho era igualmente relevante para los espermatozoides tratados con ionóforo A23187 y para los que fueron expuestos a su solvente (Figura 57).

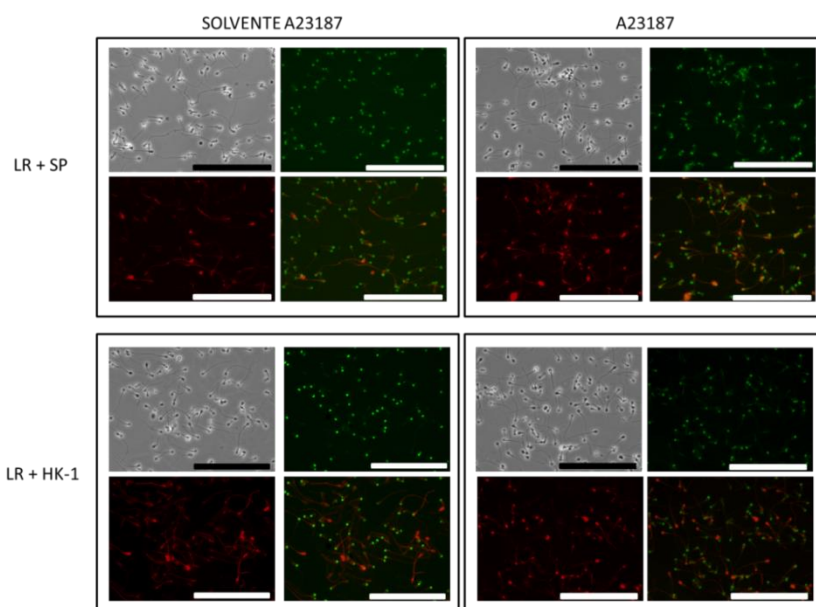


Figura 57: Micrografías de la distribución de las balsas lipídicas y las TKs SP y HK-1 durante la reacción acrosómica espermática inducida con ionóforo A23187. En cada apartado para cada TK y cada tratamiento se muestran cuatro micrografías: contraste de fases, balsas lipídicas (señal roja), TK en estudio (señal verde) y doble fluorescencia de balsas lipídicas y TK en estudio que muestra que no existe colocalización de ambas señales. Todas las micrografías están tomadas a 40X. Barra de escala = 100 μm .

V. DISCUSIÓN



1. LOS RECEPTORES NK₁, NK₂ Y NK₃ Y LAS TAQUICININAS ESTÁN PRESENTES EN EL ESPERMATOZOIDE Y EL TESTÍCULO HUMANO

Este estudio demuestra por primera la vez la presencia de los tres receptores taquicinérgicos y de las cuatro TKs conocidas en los espermatozoides humanos. Aunque determinadas TKs ya habían sido identificadas en espermatozoides humanos, en concreto la SP (Sastry et al., 1991), nuestros resultados demuestran que tanto esta TK, como la NKA, la NKB y la HK-1 están presentes a nivel de ARNm y de proteína en los espermatozoides. Los transcritos de *TAC1*, *TAC3* y *TAC4* también se han localizado en testículo humano, aunque los isoformas detectados para *TAC1* son diferentes, ya que en espermatozoides se observan los isoformas δ y γ y en testículo los isoformas β , δ y γ . El isoformo α y el isoformo β , este último uno de los más comunes en los tejidos humanos, no se expresan en los espermatozoides, donde sí lo hace el isoformo δ , de escasa presencia generalizada en los tejidos humanos. En cuanto a *TAC4*, no hemos detectado ninguna de las variantes de splicing descritas ni en testículo ni en espermatozoides. La incapacidad del espermatozoide de llevar a cabo la transcripción sugiere que estos ARNm se han sintetizado durante la espermatogénesis y por alguna razón se han mantenido en el espermatozoide, pasando a formar parte de la fracción específica de ARNm cuya presencia se ha descrito en los espermatozoides (Miller y Ostermeier, 2006). En la actualidad, la función precisa de los ARNm espermáticos sigue siendo desconocida pero se ha sugerido que juega un papel importante en el desarrollo embrionario temprano (Boerke et al., 2007; García-Herrero et al., 2010). En este sentido, estudios recientes han demostrado la existencia de diferencias considerables entre los transcriptomas de los espermatozoides de hombres fértiles e infértiles (García-Herrero et al., 2010), lo que pone de manifiesto la importancia de estos ARNm espermáticos. A nivel proteico, cada una de las TKs presenta una inmunolocalización específica y diferente. La SP se localiza mayoritariamente en la región acrosomal y la HK-1 en el flagelo, fundamentalmente en la pieza media. Adicionalmente, la SP y la HK-1 comparten localización en la región acrosomal de la cabeza espermática. De hecho, la señal para ambas desaparece cuando el

espermatozoide ha sufrido la reacción acrosómica. De todos modos, no podemos asegurar que ambos péptidos se encuentren en el interior del acrosoma, ya que podrían estar asociados a la membrana plasmática o a la MAE. Por otro lado, la NKA se localiza principalmente en la zona de unión entre flagelo y cabeza mientras que la NKB se encuentra casi exclusivamente en el segmento ecuatorial de la cabeza, lugar de relevancia en el reconocimiento entre espermatozoide y ovocito. Del mismo modo, se ha descrito por primera vez la presencia de la SP y la HK-1 en los túbulos seminíferos humanos. A medida que avanza la espermatogénesis a través de la pared del túbulo seminífero parece que la SP va perdiendo importancia a favor de la HK-1, ya que las intensidades de la señal de ambas presentan gradientes inversos a través del túbulo. Los hallazgos para la SP concuerdan con los obtenidos en otras especies (Kulkarni et al., 1992).

Por otro lado, los ARNm de los receptores taquicinérgicos no se detectaron en los espermatozoides humanos. Sin embargo, las proteínas sí se visualizaron mediante inmunofluorescencia y mediante Western blot. La localización para cada uno de los receptores fue específica y diferencial, siendo más parecida entre NK₁ y NK₂, mientras que el receptor NK₃ se encuentra fundamentalmente en la región postacrosomal y en el segmento ecuatorial, una localización similar a la descrita para la NKB, su agonista preferido. Los pesos moleculares determinados por Western blot fueron los esperados aunque cabe destacar que aparece una banda secundaria para NK₂ de 105 KDa, cuya presencia puede deberse a modificaciones postraduccionales como glicosilaciones.

2. LAS TAQUICININAS PROVOCAN UN AUMENTO DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA Y DE LA FOSFORILACIÓN DE LOS RESIDUOS DE TIROSINA ASOCIADA A LA CAPACITACIÓN.

Todas las TKs añadidas de forma exógena a los espermatozoides provocaron un aumento de la movilidad progresiva en las muestras ensayadas y un descenso de la movilidad no progresiva sin alterar el porcentaje de espermatozoides inmóviles. Este fenómeno fue dependiente de la concentración de la TK empleada y de la proporción inicial de espermatozoides con movilidad no progresiva de la muestra. Aunque estudios anteriores ya habían demostrado que la SP influía en la movilidad espermática (Sastri et al., 1991), en nuestro caso solo hemos detectado un efecto estimulatorio de la misma, tanto a bajas como a altas concentraciones. La diferencia en los resultados puede deberse a la forma de añadir las diferentes concentraciones de SP, ya que diluciones superiores al 10% del volumen final experimental inducen un descenso de la movilidad espermática, tal y como observamos en nuestros experimentos preliminares.

La potencia de acción sobre la movilidad fue distinta según la TK añadida. La TK más potente fue la SP, seguida de la NKA y la HK-1, siendo la NKB y el agonista específico de NK₃, [MePhe⁷]-NKB, las que menor efecto demostraron sobre la movilidad progresiva. Es posible que la presencia de SP en el plasma seminal, que es donde se empieza a activar la movilidad de los espermatozoides, pueda tener influencia en la adquisición de la movilidad de los espermatozoides (Sastri et al., 1991). Los experimentos realizados con los antagonistas selectivos para cada uno de los receptores taquicinérgicos pusieron de manifiesto que el efecto sobre la movilidad progresiva de las TKs se producía preferentemente a través de los receptores NK₁ y NK₂. En este sentido, estos dos receptores tienen una mayor presencia en la pieza principal del flagelo que el receptor NK₃. Los eventos que se localizan principalmente en esta parte del espermatozoide tienen una amplia relación con un aumento en la movilidad progresiva, debido a la proximidad con el axonema.

Por otro lado, tanto en el estudio de Sastri et al. (1991) como en los resultados expuestos en esta Tesis, los efectos de las TKs sobre la movilidad

fueron mantenidos en el tiempo, hecho que contrasta con la desensibilización de los receptores taquicinérgicos, descrita principalmente para NK₁ y NK₃, al ser expuestos a altas dosis de TKs (Schmidlin et al., 2003). Esto puede deberse a que los mecanismos de desensibilización del sistema taquicinérgico, presentes en otros tipos celulares, están ausentes en los espermatozoides humanos. Otra posibilidad es que el receptor NK₂, cuyo nivel de desensibilización es mucho menor, juegue un papel primordial en la mediación de los efectos de las TKs sobre la movilidad de los espermatozoides.

En cuanto a los parámetros cinéticos, la SP provoca un aumento de las velocidades curvilínea, rectilínea y promedio y un aumento en la linealidad de la trayectoria que seguían los espermatozoides, principalmente durante la primera hora de exposición a la TK. Esto parece indicar que la SP induce un aumento de movilidad activada, caracterizada por una trayectoria lineal provocada por un movimiento flagelar simétrico. Aunque también se demuestre un aumento estadísticamente significativo del movimiento lateral de la cabeza, este parámetro aparece a tiempos más largos de exposición a la SP y no se observa a los mismos tiempos en los que hay un aumento de la velocidad curvilínea que pudiera provocar una leve hiperactivación espermática. De hecho, al analizar conjuntamente los espermatozoides que presentan una alta VCL y ALH y una baja LIN, parámetros que caracterizan la población de espermatozoides hiperactivos dentro de una muestra, no observamos que la SP eleve significativamente este tipo de movilidad.

Uno de los principales responsables del inicio y mantenimiento de la movilidad activada en el espermatozoide es el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. De hecho, una de las características de la respuesta a las TKs mediada por receptores taquicinérgicos en distintos tipos celulares es el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, ya sea por liberación del ion de sus reservorios intracelulares o por apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Candenas et al., 2007). En el caso de la movilidad espermática desencadenada por las TKs, y más concretamente por la SP, el Ca^{2+} no parece ser un segundo mensajero indispensable. No pudimos observar, ni a nivel poblacional, por espectrofluorimetría, ni en célula individualizada, por microscopía de fluorescencia con dos sondas específicas de Ca^{2+} libre distintas, que la SP pudiera aumentar la concentración intracelular de este ion. Del mismo modo, tampoco se produce una movilización del ion Na^+ a través de la membrana plasmática que pudiese provocar cambios en el potencial de membrana

plasmática del espermatozoide que, a su vez, acabara induciendo una entrada secundaria de Ca^{2+} o de algún otro ion. En este sentido, otro proceso biológico característico de los espermatozoides y dependiente del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y de los cambios de potencial de membrana plasmática es la reacción acrosómica. Como era de esperar, nuestros resultados también demuestran que la SP es incapaz de provocar ningún efecto sobre este proceso, probablemente debido a la incapacidad de esta TK para movilizar iones a través de la membrana espermática.

Otro segundo mensajero esencial en la regulación de la fisiología espermática es el AMPc. La principal vía de acción del AMPc es la activación de la PKA, una quinasa de serina y treonina que está relacionada con el aumento de la fosforilación a nivel de estos residuos proteicos y, secundariamente, junto a otras quinasas de identidad desconocida, con el aumento de fosforilación de tirosina característico de la capacitación espermática. En este sentido, la SP no parece aumentar los niveles de fosforilación de serinas y treoninas por activación de la PKA. Del mismo modo, tampoco parece que se produzcan alteraciones en la fosforilación de tirosinas al analizar por Western blot los extractos proteicos de los espermatozoides tratados con SP.

Los resultados anteriores pueden deberse a la falta de sensibilidad de la técnica de Western blot que, en nuestras condiciones experimentales, no permita la detección de pequeños cambios en los niveles de fosforilación de una determinada proteína (ver Figuras 48 y 51). Por este motivo, decidimos analizar los niveles de fosforilación de tirosina en los espermatozoides empleando una técnica altamente sensible, la citometría de flujo y, en este caso, sí detectamos un aumento en las fosforilaciones en estos residuos. Las diferencias en los niveles de fosforilación se observan a concentraciones de SP de 100 nM, pero el incremento detectado a 1 μM es mucho más elevado y mantenido en el tiempo. Nuestros resultados demuestran, además, que el aumento de fosforilación está mediado por receptores taquicinérgicos, ya que se inhibe en presencia de un cocktail de antagonistas de los tres receptores. Aparte de las diferencias en la sensibilidad de la técnica, el análisis de residuos fosforilados en extractos proteicos mediante Western blot se realiza en el total de la población espermática, mientras que el estudio por citometría se realiza analizando la señal fluorescente de los espermatozoides de manera individual, de modo que el resultado refleja el porcentaje de espermatozoides que muestran la señal

específica en estudio del total de la población. Esta diferencia en el tipo de análisis y la menor fiabilidad del análisis de imagen por densitometría pueden ser las causantes de la discordancia de resultados entre las dos técnicas.

Una ruta de señalización activada por los receptores taquicinérgicos clásicamente descrita es la que implica la activación de la PKC. Nuestros resultados no demuestran que la actividad de la PKC se vea aumentada por la acción de la SP, ya que no vemos una mayor proporción de residuos de serina y treonina fosforilados por esta quinasa tras su activación por DAG. En cualquier caso, hay que tener en cuenta la falta de sensibilidad del Western blot en este tipo de experiencias, por lo que sería necesario utilizar otras técnicas para confirmar estos datos. Sería interesante analizar si las TKs podrían activar la PLC ζ específica de espermatozoide favoreciendo de algún modo la correcta fecundación del ovocito.

3. LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS ESTÁN INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA QUIMIOTÁCTICA QUE EJERCE EL FLUIDO FOLICULAR SOBRE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

En último lugar, el bloqueo específico de los tres receptores taquicinérgicos hace que la quimioatracción que ejerce un fluido del tracto reproductor femenino, como es el FF, se vea comprometida. Este es el primer indicio sobre el posible papel paracrino que el tracto reproductor femenino puede ejercer a través del sistema taquicinérgico sobre la fisiología espermática. Varios estudios han puesto de manifiesto la presencia de SP en el FF de mujeres bajo estimulación ovárica controlada con gonadotropinas sometidas a tratamientos de reproducción asistida (Jarry et al., 1988; Kerdelhué et al., 1997), aunque no se ha definido la presencia de otras TKs en el mismo. Del mismo modo, en nuestros experimentos no hemos podido determinar si este efecto sobre la quimiotaxis presenta una mayor relación con uno u otro receptor taquicinérgico, puesto que no se han realizado experiencias con cada uno de los antagonistas de forma individual. Por otro lado, uno de los principales efectos que ejerce el FF sobre los espermatozoides humanos es la hiperactivación espermática, (Yao et al., 2000; Ho y Suárez, 2001a), algo que no producen las TKs, al menos la SP. La compleja composición del FF puede provocar que algunos factores presentes en el mismo provoquen movilidad hiperactiva mientras que otros, como puede ser la SP, simplemente induzcan un aumento de la movilidad activada progresiva que ayude a los espermatozoides a alcanzar el ovocito. La proporción de FF que penetra en el oviducto junto con el complejo cúmulo-ovocito no está determinada, al igual que tampoco sabemos hasta qué lugar del tracto reproductor femenino es transportado, por lo que esta fuente de TKs a la que se pueden exponer los espermatozoides en su trayecto hasta el ovocito puede ser insuficiente para mantener una movilidad activada en el tiempo. En este sentido, la presencia de TKs a lo largo de diversos tejidos y tipos celulares del aparato reproductor femenino ha sido descrita en varias especies, incluyendo la humana (Cintado et

al., 2001; Patak et al., 2003; Patak et al., 2005; Patak et al., 2008; Pinto et al., 2009; Cejudo-Román et al., 2012; Cañete et al., 2013; García-Ortega et al., 2014; García-Ortega et al., 2016; González-Santana et al., 2016). La presencia de TKs como la NKB en células endometriales y epiteliales del oviducto, y de SP, HK-1 y NKB en células de cúmulo, podría provocar su secreción a los fluidos uterinos y tubales. Por lo tanto, la hipótesis de que el efecto paracrino que puede ejercer el sistema reproductor femenino sobre los espermatozoides a través de las TKs, promoviendo un aumento de la movilidad activada y lineal a la vez que un gradiente quimiotáctico que encamine los espermatozoides al encuentro con el ovocito, no puede ser descartada.

4. LAS PEPTIDASAS NEP Y NEP2 ESTÁN PRESENTES EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO. SU INHIBICIÓN PROVOCA UN AUMENTO DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA.

Nuestros resultados confirman la presencia de la NEP a nivel de ARNm y proteico en espermatozoides, un hecho que ya había sido descrito anteriormente (Fernández et al., 2002; Siems et al., 2003; Subirán et al., 2008). Adicionalmente, nuestros datos demuestran por primera vez la presencia de NEP2 a ambos niveles en espermatozoides. La localización de esta peptidasa en el segmento ecuatorial, lugar importante para el reconocimiento espermatozoide-ovocito, puede tener relación con el hecho de que los ratones knockout para NEP2 sean subfértiles, presentando una baja tasa de fecundación y un desarrollo embrionario anormal (Carpentier et al., 2004). Tanto NEP como NEP2 tienen una importante presencia en el plasma seminal, donde también se ha descrito la presencia de SP (Sastry et al., 1991), por lo que el control de la movilidad activada por este sistema puede ser esencial desde el inicio en la adquisición de la misma.

La inhibición de ambas peptidasas con fosforamidón provoca un efecto similar al descrito cuando se añaden TKs de forma exógena a los espermatozoides. Se produce un aumento de la movilidad progresiva en detrimento de la movilidad no progresiva, siendo su efecto más notorio en los casos en los que la movilidad inicial no progresiva era mayor. Del mismo modo, la acción del fosforamidón se reduce en presencia de antagonistas de los receptores taquicinérgicos, observándose que su efecto está mediado principalmente por los receptores NK₁ y NK₂, tal y como se describió cuando las TKs eran añadidas de forma exógena. Observamos que la combinación de antagonistas selectivos de los tres receptores taquicinérgicos no era capaz de bloquear completamente la acción del fosforamidón, lo que sugiere la participación de otros mediadores peptídicos en los efectos del fosforamidón. En este sentido, tanto la NEP como la NEP2 no son peptidasas exclusivas de TKs, sino que también metabolizan otros péptidos con papel importante en la

regulación de la función espermática, como la angiotensina-1, la bradiquinina o las encefalinas (Subirán et al., 2008; Whyteside y Turner, 2008; Gianzo et al., 2016).

Estos datos hacen pensar que las TKs también son capaces de liberarse y actuar de forma autocrina sobre los propios espermatozoides, ya que simplemente inhibiendo las enzimas encargadas de su degradación observamos los mismos efectos que cuando les añadimos TKs. En este sentido, la desaparición de la SP y la HK-1 de la región acrosomal que se produce tras la reacción acrosómica puede ser una fuente importante de TKs para esta regulación autocrina. Los espermatozoides que sufran una reacción acrosómica espontánea estarían liberando estas dos TKs al medio donde se encuentran el resto de los espermatozoides, creando un microambiente con alta concentración de SP y HK-1 que podría ejercer sobre los espermatozoides colindantes una función estimuladora de la movilidad progresiva. Curiosamente, la SP y la HK-1 son las dos TKs con mayor efecto sobre la movilidad espermática.

5. LA KISSPEPTINA Y SU RECEPTOR ESPECÍFICO KISS1R ESTÁN PRESENTES EN EL ESPERMATOZOIDE Y EL TESTÍCULO HUMANO.

Aunque desde su descubrimiento se supo que tanto la kisspeptina como el receptor KISS1R estaban presentes en el testículo (Ohtaki et al., 2001), se han realizado muy pocos estudios sobre los efectos periféricos de este sistema peptídico. Nuestros resultados han sido capaces de determinar por primera vez su presencia y localización en el espermatozoide humano. Tanto el péptido como el receptor se localizan principalmente en el segmento ecuatorial de la cabeza, lugar que desempeña un papel esencial en la fusión espermatozoide-ovocito. Mientras que la inmunoreactividad de KISS1R se extiende hacia la región acrosomal, la kisspeptina aparece ocasionalmente en la región postacrosomal. Ambas proteínas aparecen también simultáneamente, aunque con menor intensidad, en el cuello y la pieza media del flagelo, lugares involucrados en el control del Ca^{2+} , de la movilidad y del aporte energético. El análisis del peso molecular de KISS1R reveló la especificidad de la señal reconocida por inmunofluorescencia.

A nivel testicular, el análisis de la kisspeptina reveló la presencia de la misma en las células intersticiales de Leydig, un hecho que ya se había observado previamente en otras especies animales (Anjum et al., 2012; Pinilla et al., 2012; Mei et al, 2013), pero que se demuestra por primera vez en humanos. A pesar de la reproducibilidad de nuestros resultados, existen controversias en relación a la presencia y los posibles efectos de la kisspeptina a nivel testicular. Así, en ratones donde se ha asociado el promotor de la kisspeptina a β -galactosidasa, no se ha observado expresión del péptido ni se ha detectado la presencia del ARNm en cultivos celulares inmortalizados de células de Leydig, ni aparece señal positiva para la kisspeptina en ratones knockout para KISS1R, donde la síntesis de kisspeptina no tiene que verse afectada (Mei et al., 2013). Por el contrario, otros estudios han demostrado la presencia de kisspeptina y su receptor en el testículo y en espermatozoides de ratón (Hsu et al., 2014) demostrando su funcionalidad.

En nuestros experimentos también detectamos una leve presencia de la kisspeptina en los túbulos seminíferos que iba siendo más tenue a medida que nos acercábamos a la luz del mismo. En este caso, el estudio de Mei et al. (2013) demuestra que la kisspeptina se expresa a nivel ARNm en las espermátidas redondas, pero no es capaz de localizarla con anticuerpos específicos. Sin embargo, nuestros resultados demuestran la presencia de inmunoreactividad para la kisspeptina en los túbulos seminíferos, pero en las cercanías a la base de los mismos, el lugar donde se encuentran las espermatogonias o espermatoцитos primarios. En este sentido, nuestros resultados presentan concordancia con los publicados por Anjum et al. (2012).

6. LA KISSPEPTINA PRODUCE UN EFECTO BIFÁSICO SOBRE LA MOVILIDAD PROGRESIVA E INDUCE HIPERACTIVACIÓN EN LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS A TRAVÉS DE LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO.

La kisspeptina produce un aumento suave y mantenido de la $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatozoides humanos, un efecto similar al descrito en ratón, aunque en este caso con dosis más altas (Hsu et al., 2014). Como indicamos anteriormente, los niveles de Ca^{2+} intracelular están involucrados en diversos procesos fisiológicos en el espermatozoide, como la movilidad activada, la hiperactivación y la reacción acrosómica. La kisspeptina es capaz de producir cambios en dos de estos procesos: la movilidad activada y la hiperactivación. Los aumentos en la movilidad activada son modestos y se producen en dos fases: una inicial entre los 2 y los 15 minutos y otra a partir de los 60 minutos mientras que la hiperactivación se produce desde el inicio de la exposición al péptido hasta los 30 minutos. Ambos procesos son inhibidos en presencia del antagonista de KISS1R, lo cual pone de manifiesto que la acción de la kisspeptina está mediada por su receptor específico. Esta respuesta bifásica de la movilidad activada puede deberse a una desensibilización temporal de KISS1R, o a la activación de distintos mecanismos de señalización intracelular. La kisspeptina también induce una respuesta intermitente en las neuronas liberadoras de GnRH, y el antagonista de KISS1R bloquea la liberación de GnRH, pero no totalmente (Roseweir et al., 2009), de forma similar a lo que ocurre con la hiperactivación espermática, cuya inhibición no es total. Si analizamos los parámetros cinéticos, vemos que se producen aumentos en todos los parámetros que miden las velocidades de los espermatozoides y en los parámetros que miden la capacidad del espermatozoide de mover el flagelo y la cabeza, a la vez que desciende la linealidad de las trayectorias espermáticas. Por tanto, la kisspeptina es capaz de inducir simultáneamente un batido flagelar simétrico y asimétrico, un hecho que concuerda con la hipótesis de que la movilidad del espermatozoide debe alternar entre movimientos simétricos y asimétricos, con el fin de permitir la progresión a

través del tracto genital femenino y facilitar el encuentro con el ovocito (Chang y Suárez, 2010). Por otro lado, aproximadamente el 30% de las muestras estudiadas no eran capaces de responder a la kisspeptina, tanto cuando se analizaba la movilidad activada como la hiperactivación o la respuesta de Ca^{2+} . Este hecho no puede relacionarse con la variabilidad de la localización de KISS1R porque más del 95% de los espermatozoides presentan señal positiva en alguna de sus localizaciones. Probablemente el nivel de capacitación de la muestra pueda tener influencia en esta variabilidad de respuesta entre muestras. En cualquier caso, estos porcentajes de respuesta ya se habían observado en otros tipos celulares, como las neuronas liberadoras de gonadotropinas (Navarro et al., 2005; Gutiérrez-Pascual et al., 2007) o las neuronas liberadoras de hormona del crecimiento (Gutiérrez-Pascual et al., 2007). Del mismo modo, sería interesante conocer si el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se produce por entrada de Ca^{2+} extracelular o por liberación de Ca^{2+} intracelular de alguno de sus reservorios. En este sentido, los experimentos realizados en espermatozoides de ratón demuestran que la respuesta de Ca^{2+} en medios con bajo nivel de este ion es similar a la que se produce en condiciones normales, por lo que el origen de ese aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es probablemente intracelular (Hsu et al., 2014). En las neuronas liberadoras de GnRH, donde la kisspeptina produce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por liberación del Ca^{2+} almacenado en los reservorios intracelulares, se observa también un movimiento de Na^+ a través de la membrana (Liu et al., 2008). En nuestros experimentos no hemos visto que se produzca ninguna modificación del flujo de Na^+ a través de la membrana espermática. Por otro lado, en los espermatozoides, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se produce durante la capacitación y va acompañado de un aumento en los niveles de fosforilación de los residuos de tirosina de las proteínas. Sin embargo, en el caso de la kisspeptina no hemos detectado aumento de la fosforilación mediante citometría de flujo.

A pesar de la movilización de Ca^{2+} , la kisspeptina es incapaz de provocar la reacción acrosómica en espermatozoides capacitados. Este hecho puede deberse a que la forma en la que entra el Ca^{2+} en el espermatozoide por acción de la kisspeptina es más lenta y menos abrupta en comparación con el movimiento de Ca^{2+} que producen la progesterona o la proteína ZP3, inductores fisiológicos de la reacción acrosómica. Sin embargo, en ratón, la capacidad fecundante de los espermatozoides disminuye al ser tratados con el antagonista de KISS1R (Hsu et al., 2014). Este hecho podría deberse a una inhibición de la

hiperactivación espermática, que es un paso imprescindible y necesario para que se produzca la reacción acrosómica.

Al igual que planteamos anteriormente para las TKs, la kisspeptina puede ejercer una acción paracrina y participar en la comunicación entre los espermatozoides y las células del tracto reproductor femenino. Tanto en rata como en ratón y humano se ha descrito la presencia de la kisspeptina en oviducto, endometrio, ovario y células de la granulosa (Castellano et al., 2006b; Gaytán et al., 2007; Gaytán et al., 2009; Cejudo-Román et al., 2012; García-Ortega et al., 2014; Hsu et al., 2014). La kisspeptina se localiza junto a las TKs en las células endometriales y epiteliales del oviducto, siendo su presencia especialmente intensa en las células del istmo del oviducto de la rata. Los espermatozoides permanecen retenidos en las criptas de los epitelios del oviducto, que actúan como reservorios, y se liberan de los mismos gracias a la hiperactivación cuando la ovulación se produce. Curiosamente y en este sentido, se ha descrito que la expresión de la kisspeptina en el tracto reproductor femenino de la rata sigue unas pautas hormonales controladas por el ciclo estral, siendo su expresión máxima alrededor de la ovulación. Todo ello puede provocar que se exprese un mayor nivel de kisspeptina en las células endometriales y del oviducto y que pueda ser secretada, provocando que la hiperactivación espermática permita la liberación de los espermatozoides de dichos reservorios. Del mismo modo, la presencia de kisspeptina tanto en células de la granulosa como en las células del cúmulo puede realizar una función paracrina sobre los espermatozoides, ayudándolos a atravesar las distintas capas de células que rodean al ovocito antes de la fecundación.

7. LA NKB Y LA KISSPEPTINA COLOCALIZAN EN LA MISMA REGIÓN DEL ESPERMATOZOIDE.

La kisspeptina y la NKB se expresan conjuntamente en un grupo reducido de neuronas del núcleo arqueado del hipotálamo junto con otro péptido, la dinorfina. Por este motivo, este grupo de neuronas se denominan neuronas KNDy. Los resultados del presente trabajo demuestran, por primera vez, que la kisspeptina y la NKB se expresan en el espermatozoide humano y colocalizan en el segmento ecuatorial del espermatozoide, zona a la que se restringe la presencia de ambos péptidos. La dinorfina también está presente en los espermatozoides y, al igual que la kisspeptina y la NKB, se localiza mayoritariamente en el segmento ecuatorial (Subirán et al., comunicación personal). El espermatozoide representa, por tanto, el primer tipo conocido de célula KNDy no neuronal. En el hipotálamo, la NKB, la dinorfina y la kisspeptina actúan conjuntamente controlando la liberación pulsátil de la GnRH. En este sentido, algunos de los efectos llevados a cabo por la kisspeptina en los espermatozoides, modulados en cierto modo por la NKB y la dinorfina, pueden deberse a la regulación de la liberación local de la GnRH a nivel espermático. Algunos estudios han puesto de manifiesto la presencia de la GnRH y su receptor en localizaciones ajenas al hipotálamo, como el oviducto humano, las células de la granulosa y los espermatozoides (Izumi et al., 1985; Morales, 1998; Lee et al., 2000). En concreto, la GnRH es capaz de incrementar la capacidad de los espermatozoides de unirse a la zona pelúcida sin inducir la reacción acrosómica ni modificar los patrones de movilidad espermática (Morales, 1998). Nuestros resultados demuestran que la kisspeptina, sola o junto a la NKB y la dinorfina, es capaz de regular funciones espermáticas importantes. De todos modos, la importancia del papel local de la kisspeptina, la NKB y la dinorfina en los espermatozoides humanos requiere futuras investigaciones.

Paralelamente, estudios realizados en tumores han demostrado que la kisspeptina controla la expresión y/o función de determinadas metaloproteasas (Yan et al., 2001). Los resultados de otros grupos de investigación (Fernández et al., 2002; Agirregoitia et al., 2006; Subirán et al., 2008; Agirregoitia et al., 2010; Subirán et al., 2010; Agirregoitia et al., 2012; Subirán et al., 2011; Subirán et al.,

2012) y de la presente Tesis indican que las metaloproteasas NEP y NEP2 juegan un papel en el control de la función espermática a través de la regulación de los niveles endógenos de los péptidos opioides y de las TKs endógenas. Sería interesante analizar en mayor profundidad la interacción entre kisspeptina y NKB en espermatozoides y determinar si existe alguna interacción entre ambos péptidos, la NEP y la NEP2 ya que las cuatro proteínas se sitúan en el segmento ecuatorial de la cabeza espermática.

8. INNOVACIONES TÉCNICAS: LA REACCIÓN ACROSÓMICA PUEDE SER DETECTADA A TRAVÉS DE LA UNIÓN DE LA TOXINA COLÉRICA AL GANGLIÓSIDO GM₁ DE LAS BALSAS LIPÍDICAS.

Se han descrito varias técnicas que permiten diferenciar los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica de los que no, como el FITC-PSA, el FITC-PNA o la utilización de anticuerpos anti-CD46. En relación al empleo de CTB, estudios previos han señalado que cuando se realiza el marcaje de las balsas lipídicas con esta toxina en combinación con la tinción de FITC_PNA, no se detectan estas estructuras en espermatozoides acrosomo-reaccionados (Nixon et al., 2011). Por el contrario, nuestros resultados demuestran que las señales positivas para el gangliósido GM₁, detectadas por unión de CTB, aparecen en los espermatozoides en los que no se observa la señal positiva para FITC-PSA, es decir, en los espermatozoides acrosomo-reaccionados. Esto ocurre tanto en el caso de la reacción acrosómica espontánea como en la inducida por el ionóforo A23187. Aunque las razones de esta discrepancia no están claras, hay que considerar la sensible variación del protocolo que existe entre los experimentos de Nixon et al. (2011) y los nuestros, ya que en nuestro caso realizamos todas las incubaciones en hielo a 4°C y no a 37°C. A bajas temperaturas, la fluidez de la membrana se ve comprometida, lo que le otorga una mayor estabilidad que impediría que las balsas lipídicas pudieran desplazarse, favoreciendo que su marcaje fuera lo más fisiológico posible. En este sentido, un estudio de Jones et al. (2010) deja entrever que los espermatozoides que sufren una reacción acrosómica espontánea presentan balsas lipídicas en la región acrosomal. Del mismo modo, también se ha descrito que las fracciones resistentes a detergentes procedentes de las balsas lipídicas son capaces de unirse a la zona pelúcida ovocitaria y contienen una amplia gama de proteínas relacionadas con la interacción espermatozoide-ovocito (Bou Khalil et al., 2006; Nixon et al., 2008; Nixon et al., 2011). Aunque se proponga que muchas de estas proteínas llegan a la región acrosomal por migración desde la membrana plasmática o desde la MAE y la MAI, no es descartable pensar que la propia MAI presente un alto contenido en balsas lipídicas donde se encuentren

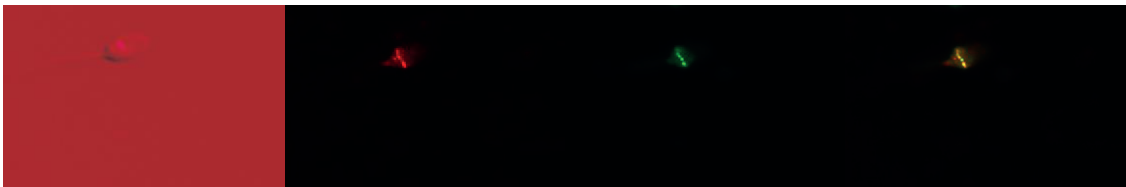
asociadas estas proteínas. En este sentido, la importancia del segmento ecuatorial en el reconocimiento entre gametos está perfectamente establecida y los espermatozoides acrosomo-reaccionados presentan una intensa señal para CTB en esa región. Para comprobar los resultados obtenidos, sería interesante realizar experiencias donde pudiéramos visualizar, simultáneamente y tras la inducción de la reacción acrosómica, las balsas lipídicas y la presencia de IZUMO, la proteína espermática más importante para llevar a cabo una correcta fecundación y con presencia demostrada en espermatozoides acrosomo-reaccionados (Inoue et al., 2005).

9. POSIBLES APLICACIONES CLÍNICAS

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral pueden ser de utilidad en clínica, en relación con el proceso reproductivo. Nuestros datos sugieren que el sistema reproductor femenino, a través de las TKs y la kisspeptina, pueden establecer una comunicación e interferir sobre la movilidad e hiperactivación de los espermatozoides. Por tanto, el estudio de estas interacciones puede ser de interés en los tratamientos de reproducción asistida, en el caso de hombres subfértiles con indicación de inseminaciones artificiales. La adición de TKs o kisspeptina a una muestra de un paciente al que se le indica la inseminación artificial y la medida del porcentaje de respuesta a las mismas puede aportarnos una idea aproximada del comportamiento que tendrán los espermatozoides una vez son depositados en el tracto reproductor femenino. En este sentido, especialmente para la kisspeptina, donde el porcentaje de respuesta de las muestras ensayadas no es del 100%, sería interesante determinar si varias muestras de un mismo paciente obtenidas a distintos tiempos son capaces de dar la misma o distintas respuestas a este péptido, para averiguar si el hecho de que no exista uniformidad en la respuesta a la kisspeptina pudiera estar influenciado por alguna característica individual del paciente o si es independiente para cada muestra de semen, sin tener en cuenta si procede del mismo varón o no. En el caso de encontrar una correlación entre la infertilidad y el grado de respuesta a TKs o a kisspeptina, cuando las muestras de un mismo individuo presentan una menor respuesta a TKs o a kisspeptina, podríamos intuir que el comportamiento de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino no va a ser el adecuado para alcanzar el ovocito, lo que permitiría desaconsejar la realización de la inseminación artificial.

Del mismo modo, podría resultar de interés el cribado de los donantes de semen según el porcentaje de respuesta a TKs o a kisspeptina que presenten sus muestras, ya que este hecho podría permitirnos destinar las muestras de un donante hacia tratamientos de inseminación artificial o directamente a ciclos de microinyección espermática intracitoplasmática. El desarrollo futuro de estos estudios nos permitirá identificar la verdadera utilidad de las TKs y la kisspeptina y su contribución en el avance de la medicina reproductiva y los tratamientos de reproducción asistida.

VI. CONCLUSIONES



1. Todas las taquicininas y los receptores taquicinérgicos están presentes en el espermatozoide y el testículo humano y presentan localizaciones específicas y diferenciales.
2. Las taquicininas, actuando a través de sus receptores específicos, regulan la movilidad espermática e inducen un aumento de la movilidad progresiva, uno de los parámetros más importantes y definitorios de la fertilidad masculina.
3. La sustancia P induce la capacitación espermática pero se muestra incapaz de producir la hiperactivación o la reacción acrosómica. Sin embargo, la SP se libera del espermatozoide durante la reacción acrosómica, lo que sugiere que puede participar en los procesos de acceso del espermatozoide al ovocito durante la fertilización.
4. El sistema taquicinérgico parece estar involucrado en la respuesta quimiotáctica que ejerce el fluido folicular sobre los espermatozoides humanos.
5. Las dos principales enzimas responsables del metabolismo de las taquicininas, las peptidasas NEP y NEP2, están presentes en el espermatozoide humano y su inhibición provoca un aumento de la movilidad espermática.
6. La kisspeptina y su receptor específico, KISS1R, están presentes en el espermatozoide y el testículo humano. En el espermatozoide, la kisspeptina colocaliza con la neurocinina B en el segmento ecuatorial de la cabeza.
7. La kisspeptina produce un efecto bifásico sobre la movilidad progresiva en el que se alternan periodos de aumento de la movilidad con otros en los que no se observan alteraciones. La kisspeptina induce hiperactivación en los espermatozoides humanos pero no provoca la reacción acrosómica.
8. Por último, y como aportación técnica de posible interés en clínica, nuestros resultados demuestran que la reacción acrosómica puede ser detectada a través de la unión de la toxina colérica al gangliósido GM₁ de las balsas lipídicas.

VII. BIBLIOGRAFÍA



- Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, De la Vega-Beltrán JL, Treviño CL, Félix R, Darszon A. KATP channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation. *Dev Biol* 2006; 289(2):395-405.
- Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev* 2007; 53(2):367-378.
- Adams IR, McLaren A. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 2002; 129(5):1155-1164.
- Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR. Capacitation state-dependent changes in adenosine receptors and their regulation of adenylyl cyclase/cAMP. *Mol Reprod Dev* 2002; 63(2):245-255.
- Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR. Calcitonin acts a first messenger to regulate adenylyl cyclase/cAMP and mammalian sperm function. *Mol Reprod Dev* 2003; 65(2):228-236.
- Adeoya-Osiguwa SA, Gibbons R, Fraser LR. Identification of functional alpha2- and beta-adrenergic receptors in mammalian spermatozoa. *Hum Reprod* 2006; 21(6):1555-1563.
- Adham IM, Nayernia K, Engel W. Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol Reprod Dev* 1997; 46(3):370-376.
- Agirregoitia E, Carracedo A, Subirán N, Valdivia A, Agirregoitia N, Peralta L, Velasco G, Irazusta J. The CB(2) cannabinoid receptor regulates human sperm cell motility. *Fertil Steril* 2010; 93(5):1378-1387.
- Agirregoitia E, Subirán N, Valdivia A, Gil J, Zubero J, Irazusta J. Regulation of human sperm motility by opioid receptors. *Andrologia* 2012; 44 Suppl 1:578-585.
- Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subirán N, Ochoa C, Irazusta J. Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(12):4969-4975.
- Aitken JB, Naumovski N, Curry B, Grupen CG, Gibb Z, Aitken RJ. Characterization of an L-amino acid oxidase in equine spermatozoa. *Biol Reprod* 2015a; 92(5):125.
- Aitken RJ, Baker MA, Nixon B. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl* 2015b; 17(4):633-639.
- Aitken RJ, Buckingham DW, Fang HG. Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *J Androl* 1993; 14(2):132-141.

- Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987; 81(2):459-469.
- Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010; 25(10):2415-2426.
- Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2016; 28(1-2):1-10.
- Aitken RJ, Nixon B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(12):785-793.
- Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, Van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 1995; 108(Pt 5):2017-2025.
- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 2014; 16(1):31-38.
- Aitken RJ, Whiting S, De Iuliis GN, McClymont S, Mitchell LA, Baker MA. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2012; 287(39):33048-33060.
- Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis, GN, Koppers AJ, McLaughlin EA. *Cis*-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(10):4154-4163.
- Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, Hernández M, Martín JD, Candenas ML. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem* 2004; 11(15):2045-2081.
- Álvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987; 8(5):338-348.
- Alves ID, Delaroche D, Mouillac B, Salamon Z, Tollin G, Hruby VJ, Lavielle S, Sagan S. The two NK-1 binding sites correspond to distinct, independent, and non-interconvertible receptor conformational states as confirmed by plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *Biochemistry* 2006; 45(16):5309-5318.
- Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* 2013; 146(5):R163-R174.
- Amstalden M, Coolen LM, Hemmerle AM, Billings HJ, Connors JM, Goodman RL, Lehman MN. Neurokinin 3 receptor immunoreactivity in the septal region, preoptic area and hypothalamus of the female sheep: colocalisation in neurokinin B cells of the arcuate nucleus but

- not in gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 2010; 22(1):1-12.
- Anastasi A, Montecucchi P, Erspamer V, Visser J. Amino acid composition and sequence of kassinin, a tachykinin dodecapeptide from the skin of the African frog *Kassina senegalensis*. *Experientia* 1977; 33(7):857-858.
- Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS, Bremner WJ. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(9):3341-3345.
- Anderson DJ, Abbott AF, Jack RM. The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(21):10051-10055.
- Anderson DJ, Michaelson JS, Johnson PM. Trophoblast/leukocyte-common antigen is expressed by human testicular germ cells and appears on the surface of acrosome-reacted sperm. *Biol Reprod* 1989; 41(2):285-293.
- Anderson RA Jr, Feathergill KA, Rawlins RG, Mack SR, Zaneveld LJ. Atrial natriuretic peptide: a chemoattractant of human spermatozoa by a guanylate cyclase-dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 1995; 40(3):371-378.
- Angelova P, Davidoff M. Immunocytochemical demonstration of substance P in hamster Leydig cells during ontogenesis. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1989; 103(4):560-566.
- Angelova P, Davidoff M, Baleva K, Staykova M. Substance P- and neuron-specific enolase-like immunoreactivity of rodent Leydig cells in tissue section and cell culture. *Acta Histochem* 1991a; 91(2):131-139.
- Angelova PA, Davidoff MS, Kanchev LN. Substance P-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Andrologia* 1991b; 23(5):325-327.
- Angelova P, Davidoff M, Kanchev L, Baleva-Ivanova K. Substance P: immunocytochemical localization and biological role in hamster gonads during ontogenesis. *Funct Dev Morphol* 1991c; 1(1):3-8.
- Anifandis G, Messini CI, Dafopoulos K, Daponte A, Messinis IE. Sperm contributions to oocyte activation: more than meets the eye. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33(3):313-316.
- Anjum S, Krishna A, Sridaran R, Tsutsui K. Localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), kisspeptin and GnRH receptor and their possible roles in testicular activities from birth to senescence in mice. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 2012; 317(10):630-644.
- Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* 2008; 52(5-6):463-472.

- Armon L, Ben-Ami I, Ron-El R, Eisenbach M. Human oocyte-derived sperm chemoattractant is a hydrophobic molecule associated with a carrier protein. *Fertil Steril* 2014; 102(3):885-890.
- Armon L, Eisenbach M. Behavioral mechanism during human sperm chemotaxis: involvement of hyperactivation. *PLoS One* 2011; 6(12):e28359.
- Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. Activation of mouse sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(23):13004-13009.
- Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(12):6757-6762.
- Artico M, Bronzetti E, Saso L, Felici LM, D'Ambrosio A, Forte F, Grande C, Ortolani F. Immunohistochemical profile of some neurotransmitters and neurotrophins in the seminiferous tubules of rats treated by lonidamine. *Eur J Histochem* 2007; 51(1):19-24.
- Asano A, Nelson JL, Zhang S, Travis AJ. Characterization of the proteomes associating with three distinct membrane raft sub-types in murine sperm. *Proteomics* 2010; 10(19):3494-3505.
- Austin CR. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B* 1951; 4(4):581-596.
- Austin CR. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 1952; 170(4321):326.
- Austin CR, Bishop MW. Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1958; 149(935):234-240.
- Avella MA, Baibakov B, Dean J. A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *J Cell Biol* 2014; 205(6):801-809.
- Avidan N, Tamary H, Dgany O, Cattani D, Pariente A, Thulliez M, Borot N, Moati L, Barthelme A, Shalmon L, Krasnov T, Ben-Asher E, Olender T, Khen M, Yaniv I, Zaizov R, Shalev H, Delaunay J, Fellous M, Lancet D, Beckmann JS. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet* 2003; 11(7):497-502.
- Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem* 1994; 269(50):31845-31849.
- Backholer K, Smith J, Clarke IJ. Melanocortins may stimulate reproduction by activating orexin neurons in the dorsomedial hypothalamus and kisspeptin neurons in the preoptic area of the ewe. *Endocrinology* 2009; 150(12):5488-5497.
- Baker MA, Hetherington L, Aitken RJ. Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-

- associated hyperactivation of murine spermatozoa. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 15):3182-3192.
- Baker MA, Naumovski N, Hetherington L, Weinberg A, Velkov T, Aitken RJ. Head and flagella subcompartmental proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics* 2013; 13(1):61-74.
- Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* 1991; 12(5):323-330.
- Ban N, Sasaki M, Sakai H, Ueda K, Inagaki N. Cloning of ABCA17, a novel rodent sperm-specific ABC (ATP-binding cassette) transporter that regulates intracellular lipid metabolism. *Biochem J* 2005; 389(Pt 2):577-585.
- Bánfi B, Molnár G, Maturana A, Steger K, Hegedűs B, Demaurex N, Krause KH. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 2001; 276(40):37594-37601.
- Barratt CLR, Cooke ID. Sperm transport in the human female reproductive tract - a dynamic interaction. *Int J Androl* 1991; 14(6):394-411.
- Battistone MA, Da Ros VG, Salicioni AM, Navarrete FA, Krapf D, Visconti PE, Cuasnicú PS. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(9):570-580.
- Bavister BD. Capacitation of golden hamster spermatozoa during incubation in culture medium. *J Reprod Fert* 1973; 35(1):161-163.
- Baxendale RW, Fraser LR. Evidence for multiple distinctly localized adenyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2003; 66(2):181-189.
- Baxendale RW, Fraser LR. Mammalian sperm phosphodiesterases and their involvement in receptor-mediated cell signaling important for capacitation. *Mol Reprod Dev* 2005; 71(4):495-508.
- Becker JA, Mirjolet JF, Bernard J, Burgeon E, Simons MJ, Vassart G, Parmentier M, Libert F. Activation of GPR54 promotes cell cycle arrest and apoptosis of human tumor cells through a specific transcriptional program not shared by other Gq-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326(3):677-686.
- Bedford JM. Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol Reprod* 1998; 59(6):1275-1287.
- Bedford JM. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2004; 79(2):429-460.
- Bedford JM, Moore HD, Franklin LE. Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exp Cell Res* 1979; 119(1):119-126.

- Bedu-Addo K, Lefièvre L, Moseley FL, Barratt CL, Publicover SJ. Bicarbonate and bovine serum albumin reversibly "switch" capacitation-induced events in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(9):683-691.
- Bendel-Stenzel MR, Gomperts M, Anderson R, Heasman J, Wylie C. The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the mouse. *Mech Dev* 2000; 91(1-2):143-152.
- Benoff S. Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. *Front Biosci* 1998; 3:D1220-D1240.
- Beuckmann CT, Sinton CM, Miyamoto N, Ino M, Yanagisawa M. N-type calcium channel $\alpha 1B$ subunit ($Ca_v2.2$) knock-out mice display hyperactivity and vigilance state differences. *J Neurosci* 2003; 23(17):6793-6797.
- Bian F, Mao G, Guo M, Mao G, Wang J, Li J, Han Y, Chen X, Zhang M, Xia G. Gradients of natriuretic peptide precursor A (NPPA) in oviduct and of natriuretic peptide receptor 1 (NPR1) in spermatozoon are involved in mouse sperm chemotaxis and fertilization. *J Cell Physiol* 2012; 227(5):2230-2239.
- Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 2014; 508(7497):483-487.
- Bielfeld P, Jeyendran RS, Zaneveld LJ. Human spermatozoa do not undergo the acrosome reaction during storage in the cervix. *Int J Fertil* 1991; 35(5):302-306.
- Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, Malli R, Sharabi A, Hiden U, Graier W, Knöfler M, Andreae F, Wagner O, Quaranta V, Desoye G. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 8):1319-1328.
- Billings HJ, Connors JM, Altman SN, Hileman SM, Holaskova I, Lehman MN, McManus CJ, Nestor CC, Jacobs BH, Goodman RL. Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 2010; 151(8):3836-3846.
- Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod*. 1991 Mar;44(3):398-403.
- Blackmore PF, Beebe SJ, Danforth DR, Alexander N. Progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *Biol Chem* 1990; 265(3):1376-1380.
- Bloomquist BT, Beauchamp MR, Zhelnin L, Brown SE, Gore-Willse AR, Gregor P, Cornfield LJ. Cloning and expression of the human galanin receptor GalR2. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243(2):474-479.

- Boatman DE, Robbins RS. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reaction. *Biol Reprod* 1991; 44(5):806-813.
- Boerke A, Brouwers JF, Olkkonen VM, Van de Lest CH, Sostaric E, Schoevers EJ, Helms JB, Gadella BM. Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. *Biol Reprod* 2013; 88(1):21.
- Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology* 2007;68 Suppl 1:S147-155.
- Boerke A, Tsai PS, García-Gil N, Brewis IA, Gadella BM. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology* 2008; 70(8):1188-1196.
- Bosch MA, Xue C, Rønnekleiv OK. Kisspeptin expression in guinea pig hypothalamus: effects of 17 β -estradiol. *J Comp Neurol* 2012; 520(10):2143-2162.
- Bou Khalil M, Chakrabandhu K, Xu H, Weerachatanukul W, Buhr M, Berger T, Carmona E, Vuong N, Kumarathan P, Wong PT, Carrier D, Tanphaichitr N. Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid. *Dev Biol* 2006; 290(1):220-235.
- Branham MT, Bustos MA, De Blas GA, Rehmann H, Zarelli VE, Treviño CL, Darszon A, Mayorga LS, Tomes CN. Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis. *J Biol Chem* 2009; 284(37):24825-24839.
- Braun RE, Behringer RR, Peschon JJ, Brinster RL, Palmiter RD. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature* 1989; 337(6205):373-376.
- Bravo A, Treulen F, Uribe P, Boguen R, Felmer R, Villegas JV. Effect of mitochondrial calcium uniporter blocking on human spermatozoa. *Andrologia* 2015; 47(6):662-668.
- Breil JD, Wassarman PM. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* 1983; 95(2):317-324.
- Brewis IA, Clayton R, Barratt CL, Hornby DP, Moore HD. Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(8):583-589.
- Brokaw CJ. Effects of viscosity and ATP concentration on the movement of reactivated sea-urchin flagella. *J Exp Biol* 1975; 62(3):701-719.
- Brokaw CJ. Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembrated sea urchin sperm flagella. *J Cell Biol* 1979; 82(2):401-411.
- Brouwers JF, Boerke A, Silva PF, García-Gil N, Van Gestel RA, Helms JB, Van de Lest CH, Gadella BM. Mass spectrometric detection of

- cholesterol oxidation in bovine sperm. *Biol Reprod* 2011; 85(1):128-136.
- Brouwers JF, Gadella BM, Van Golde LM, Tielens AG. Quantitative analysis of phosphatidylcholine molecular species using HPLC and light scattering detection. *J Lipid Res* 1998; 39(2):344-353.
- Bruckbauer A, James P, Zhou D, Yoon JW, Excell D, Korchev Y, Jones R, Klenerman D. Nanopipette of individual molecules to cellular compartments for single-molecule fluorescence tracking. *Biophys J* 2007; 93(9):3120-3131.
- Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. Cytosolic adenyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(1):79-84.
- Buffone MG, Foster JA, Gerton GL. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *Int J Dev Biol* 2008; 52(5-6):511-522.
- Buffone MG, Hirohashi N, Gerton GL. Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biol Reprod* 2014; 90(5):112.
- Buffone MG, Ijiri TW, Cao W, Merdushev T, Aghajanian HK, Gerton GL. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol Reprod Dev* 2012; 79(1):4-18.
- Buffone MG, Kim KS, Doak BJ, Rodríguez-Miranda E, Gerton GL. Functional consequences of cleavage, dissociation and exocytotic release of ZP3R, a C4BP-related protein, from the mouse sperm acrosomal matrix. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 17):3153-3160.
- Bunch DO, Welch JE, Magyar PL, Eddy EM, O'Brien DA. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 1998; 58(3):834-841.
- Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 2006; 498(5):712-726.
- Burkman LJ. Hyperactivated motility of human spermatozoa during *in vitro* capacitation and implications for fertility. In: Controls of sperm motility: biological and clinical aspects. CRC Press 1990 pp. 303-329.
- Burnett LA, Anderson DM, Rawls A, Bieber AL, Chandler DE. Mouse sperm exhibit chemotaxis to allurin, a truncated member of the cysteine-rich secretory protein family. *Dev Biol* 2011; 360(2):318-328.
- Bustos MA, Lucchesi O, Ruete MC, Mayorga LS, Tomes CN. Rab27 and Rab3 sequentially regulate human sperm dense-core granule exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(30):E2057-2066.
- Buttke DE, Nelson JL, Schlegel PN, Hunnicutt GR, Travis AJ. Visualization of GM1 with cholera toxin B in live epididymal versus ejaculated

- bull, mouse, and human spermatozoa. *Biol Reprod* 2006; 74(5):889-895.
- Byrne K, Leahy T, McCulloch R, Colgrave ML, Holland MK. Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. *Proteomics* 2012; 12(23-24):3559-3579.
- Caballero-Campo P, Buffone MG, Benencia F, Conejo-García JR, Rinaudo PF, Gerton GL. A role for the chemokine receptor CCR6 in mammalian sperm motility and chemotaxis. *J Cell Physiol* 2014; 229(1):68-78.
- Caberlotto L, Hurd YL, Murdock P, Wahlin JP, Melotto S, Corsi M, Carletti R. Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain. *Eur J Neurosci* 2003; 17(9):1736-1746.
- Candenás L, Lecci A, Pinto FM, Patak E, Maggi CA, Pennefather JN. Tachykinins and tachykinin receptors: effects in the genitourinary tract. *Life Sci* 2005; 76(8):835-862.
- Candenás ML, Magraner J, Armesto CP, Anselmi E, Nieto PM, Martín JD, Advenier C, Pinto FM. Changes in the expression of tachykinin receptors in the rat uterus during the course of pregnancy. *Biol Reprod* 2001; 65(2):538-543.
- Candenás ML, Pennefather JN, Kerr K, Pérez-Hernández N, Pinto FM. Tachykinins and smooth muscle function. In: New frontiers in smooth muscle biology and physiology. Transworld Research Network 2007 pp 383-409.
- Cañete H, Dorta I, Hernández M, Cejudo-Román A, Candenás L, Pinto FM, Valladares F, Báez D, Montes de Oca F, Bello AR, Almeida TA. Differentially regulated expression of neurokinin B (NKB)/NK3 receptor system in uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 2013; 28(7):1799-1808.
- Cao W, Harnett KM, Pricolo VE. NK2 receptor-mediated spontaneous phasic contractions in normal and ulcerative colitis human sigmoid colon. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317(3):1349-1355.
- Capallo-Obermann H, Schulze W, Jastrow H, Baukloh V, Spiess AN. Highly purified spermatozoal RNA obtained by a novel method indicates an unusual 28S/18S rRNA ratio and suggests impaired ribosome assembly. *Mol Hum Reprod* 2011; 17(11):669-678.
- Carlson AE, Hille B, Babcock DF. External Ca^{2+} acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol* 2007; 312(1):183-192.
- Carlson AE, Quill TA, Westenbroek RE, Schuh SM, Hille B, Babcock DF. Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. *J Biol Chem* 2005; 280(37):32238-32244.
- Carlsson L, Ronquist G, Eliasson R, Egberg N, Larsson A. Flow cytometric technique for determination of prostasomal quantity, size and expression of CD10, CD13, CD26 and CD59 in human seminal plasma. *Int J Androl* 2006; 29(2):331-338.

- Carpentier M, Guillemette C, Bailey JL, Boileau G, Jeannotte L, DesGroseillers L, Charron J. Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1. *Mol Cell Biol* 2004; 24(10):4428-4437.
- Carr DW, Usselman MC, Acott TS. Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol Reprod* 1985; 33(3):588-595.
- Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss SB. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol* 1996; 180(1):284-296.
- Castaño JP, Martínez-Fuentes AJ, Gutiérrez-Pascual E, Vaudry H, Tena-Sempere M, Malagón MM. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides* 2009; 30(1):10-15.
- Castellano JM, Gaytán M, Roa J, Vigo E, Navarro VM, Bellido C, Dieguez C, Aguilar E, Sánchez-Criado JE, Pellicer A, Pinilla L, Gaytán F, Tena-Sempere M. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* 2006b; 147(10):4852-4862.
- Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castaño JP, Malagón MM, Aguilar E, Dieguez C, Magni P, Pinilla L, Tena-Sempere M. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol* 2006a; 257-258:75-83.
- Castellano LE, Treviño CL, Rodríguez D, Serrano CJ, Pacheco J, Tsutsumi V, Félix R, Darszon A. Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar function motility. *FEBS Lett* 2003; 541(1-3):69-74.
- Castillo Bennett J, Roggero CM, Mancifesta FE, Mayorga LS. Calcineurin-mediated dephosphorylation of synaptotagmin VI is necessary for acrosomal exocytosis. *J Biol Chem* 2010; 285(34):26269-26278.
- Cataldo L, Baig K, Oko R, Mastrangelo MA, Kleene KC. Developmental expression, intracellular localization, and selenium content of the cysteine-rich protein associated with the mitochondrial capsules of mouse sperm. *Mol Reprod Dev* 1996; 45(3):320-331.
- Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:521-555.
- Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 2007; 49(2):124-141.
- Cejudo-Román A, Pinto FM, Dorta I, Almeida TA, Hernández M, Illanes M, Tena-Sempere M, Candenas L. Analysis of the expression of neurokinin B, kisspeptin, and their cognate receptors NK3R and KISS1R in the human female genital tract. *Fertil Steril* 2012; 97(5):1213-1219.

- Chalbi M, Barraud-Lange V, Ravaux B, Howan K, Rodríguez N, Soule P, Ndzoudi A, Boucheix C, Rubinstein E, Wolf JP, Ziyyat A, Pérez E, Pincet F, Gourier C. Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development* 2014; 141(19):3732-3739.
- Champagne DE, Ribeiro JM. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(1):138-142.
- Chandrashekar IR, Cowsik SM. Three-dimensional structure of the mammalian tachykinin peptide neurokinin A bound to lipid micelles. *Biophys J* 2003; 85(6):4002-4011.
- Chang H, Suárez SS. Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biol Reprod* 2010; 83(4):507-513.
- Chang H, Suárez SS. Unexpected flagellar movement patterns and epithelial binding behavior of mouse sperm in the oviduct. *Biol Reprod* 2012; 86(140):141-148.
- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168(4277):697-698.
- Chang MM, Leeman SE. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J Biol Chem* 1970; 245(18):4784-4790.
- Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol* 1971; 232(29):86-87.
- Chapman D. Fluidity and phase transitions of cell membranes. *Biomembranes* 1975; 7:1-9.
- Chávez JC, De la Vega-Beltrán JL, Escoffier J, Visconti PE, Treviño CL, Darszon A, Salkoff L, Santi CM. Ion permeabilities in mouse sperm reveal an external trigger for SL03-dependent hyperpolarization. *PLoS One* 2013; 8(4):e60578.
- Chemes HE, Álvarez-Sedo C. Tales of the tail and sperm head aches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian J Androl* 2012; 14(1):14-23.
- Chemes HE, Puigdomenech ET, Carizza C, Olmedo SB, Zanchetti F, Hermes R. Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod* 1999; 14(7):1811-1818.
- Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionary conserved bicarbonate sensor. *Science* 2000; 289(5479):625-628.
- Cheng A, Le T, Palacios M, Bookbinder LH, Wassarman PM, Suzuki F, Bleil JD. Sperm egg recognition in the mouse: characterization of sp56,

- a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J Cell Biol* 1994; 125(4):867-878.
- Cherry RJ. Rotational and lateral diffusion of membrane proteins. *Biochem Biophys Acta* 1979; 553(4):289-327.
- Chiarella P, Puglisi R, Sorrentino V, Boitani C, Stefanini M. Ryanodine receptors are expressed and functionally active in mouse spermatogenic cells and their inhibition interferes with spermatogonial differentiation. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 18):4127-4134.
- Chithiwala ZH, Lee HC, Hill DL, Jellerette-Nolan T, Fissore R, Grow D, Dumesic DA. Phospholipase C-zeta deficiency as a cause for repetitive oocyte fertilization failure during ovarian stimulation for in vitro fertilization with ICSI: a case report. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32(9):1415-1419.
- Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R. Tachykinin (substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology* 1991; 128(5):2441-2448.
- Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 1998; 281(5384):1857-1859.
- Choi TH, Landim-Alverenga FC, Seidel GE Jr, Squires EL. Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes. *J Anim Sci* 2003; 81(8):2080-2087.
- Choi YH, Toyoda Y. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. *Biol Reprod* 1998; 59(6):1328-1333.
- Chung JJ, Navarro B, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun* 2011; 2:153.
- Cintado CG, Pinto FM, Devillier P, Mérida A, Candenás ML. Increase in neurokinin B expression and in tachykinin NK(3) receptor-mediated response and expression in the rat uterus with age. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299(3):934-938.
- Clark JM, Eddy E. Fine structural observations on the origin and association of primordial germ cells of the mouse. *Dev Biol* 1975; 47(1):136-155.
- Clarkson J, D'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 2009; 21(8):673-682.
- Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006; 147(12):5817-5825.

- Clements MK, McDonald TP, Wang R, Xie G, O'Dowd BF, George SR, Austin CP, Liu Q. FMRFamide-related neuropeptides are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284(5):1189-1193.
- Cohen R, Buttke DE, Asano A, Mukai C, Nelson JL, Ren D, Miller RJ, Cohen-Kutner M, Atlas D, Travis AJ. Lipid modulation of calcium flux through CaV2.3 regulates acrosome exocytosis and fertilization. *Dev Cell* 2014; 28(3):310-321.
- Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Dor J, Mashiach S, Eisenbach M. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(24):11039-11043.
- Colledge WH. GPR54 and kisspeptins. *Results Probl Cell Differ* 2008; 46:117-143.
- Colledge WH. Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology. *Peptides* 2009; 30(1):34-41.
- Cooper PE, Fernstrom MH, Rorstad OP, Leeman SE, Martin JB. The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res* 1981; 218(1-2):219-232.
- Corander MP, Challis BG, Thompson EL, Jovanovic Z, Loraine Tung YC, Rimmington D, Huhtaniemi IT, Murphy KG, Topaloglu AK, Yeo GS, O'Rahilly S, Dhillo WS, Semple RK, Coll AP. The effects of neurokinin B upon gonadotrophin release in male rodents. *J Neuroendocrinol* 2010; 22(3):181-187.
- Crane LH, Williams MJ, Nimmo AJ, Hamlin GP. Estrogen-dependent regulation of neurokinin 3 receptor-mediated uterine contractility in the rat. *Biol Reprod* 2002; 67(5):1480-1487.
- Cravo RM, Margatho LO, Osborne-Lawrence S, Donato J Jr, Atkin S, Bookout AL, Rovinsky S, Frazão R, Lee CE, Gautron L, Zigman JM, Elias CF. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience* 2011; 173:37-56.
- Cross NL. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on the acrosomal responsiveness of human sperm. *Mol Reprod Dev* 1999; 53(1):92-98.
- Cross NL. Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biol Reprod* 2003; 69(2):529-534.
- Cross NL. Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol Reprod* 2004; 71(4):1367-1373.
- D'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(25):10714-10719.
- Dan JC. Studies on the acrosome. III. Effect of calcium deficiency. *Biol Bull* 1954; 107:335-349.

- Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, Nasigaki T, Treviño CL, Wood C, Beltrán C. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 2006a; 131(6):977-988.
- Darszon A, López-Martínez P, Acevedo JJ, Hernández-Cruz A, Treviño CL. T-type Ca^{2+} channels in sperm function. *Cell Calcium* 2006b; 40(2):241-252.
- Darszon A, Nishigaki T, Beltrán C, Treviño CL. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev* 2011; 91(4):1305-1355.
- Dasgupta S, Mills CL, Fraser LR. Ca^{2+} -related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil* 1993; 99(1):135-143.
- DasGupta S, Mills CL, Fraser LR. A possible role for Ca^{2+} -ATPase in human sperm capacitation. *J Reprod Fertil* 1994; 102(1):107-116.
- Davis BK, Byrne R, Bedigian K. Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during *in vitro* incubation of rat sperm cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(3):1546-1550.
- Davis BK, Byrne R, Hungund B. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1979; 558(3):257-266.
- De Blas GA, Darszon A, Ocampo AY, Serrano CJ, Castellano LE, Hernández-González EO, Chirinos M, Larrea F, Beltrán C, Treviño CL. TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS One* 2009; 4(6):e6095.
- De Blas GA, Roggero CM, Tomes CN, Mayorga LS. Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol* 2005; 3(10):e323.
- De Croft S, Boehm U, Herbison AE. Neurokinin B activates arcuate kisspeptin neurons through multiple tachykinin receptors in the male mouse. *Endocrinology* 2013; 154(8):2750-2760.
- De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009; 81(3):517-524.
- De Iuliis GN, Wingate JK, Koppers AJ, McLaughlin EA, Aitken RJ. Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(5):1968-1975.
- De la Vega-Beltrán JL, Sánchez-Cárdenas C, Krapf D, Hernández-González EO, Wertheimer E, Treviño CL, Visconti PE, Darszon A. Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *J Biol Chem* 2012; 287(53):44384-44393.

- De Lamirande E, Gagnon C. Effect of transglutaminase substrates and inhibitors on the motility of demembrated spermatozoa. *Gamete Res* 1989; 22(2):179-192.
- De Lamirande E, Gagnon C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 1993; 16(1):21-25.
- De Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 1997; 3(3):175-194.
- De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Criobiology* 1990; 27(2):171-183.
- De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(19):10972-10976.
- De Swert KO, Joos GF. Extending the understanding of sensory neuropeptides. *Eur J Pharmacol* 2006; 533(1-3):171-181.
- De Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 2003; 68(6):2122-2134.
- Debeljuk L, Bartke A. Immunoreactive substance P and neurokinin A in the hypothalamus and anterior pituitary gland of Siberian and Syrian hamsters and of rats. *J Reprod Fertil* 1994; 101(2):427-434.
- Debeljuk L, Rao JN, Bartke A. Tachykinins and their gene expression in the anterior pituitary of the siberian hamster-Effects of photoperiod, thyroid hormones, and analogs of hypothalamic hormones. *Endocrine* 1995; 3(11):839-843.
- Debeljuk L, Rao JN, Bartke A. Tachykinins and their possible modulatory role on testicular function: a review. *Int J Androl* 2003; 26(4):202-210.
- Decourt C, Tillet Y, Caraty A, Franceschini I, Briant C. Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus Interactions with GnRH neuronal system. *J Chem Neuroanat* 2008; 36(3-4):131-137.
- DeFino MC, Wacker JL, Lyssand JS, Wang EH, Hague C. Differential regulation of GPR54 transcription by specificity protein-1 and partial estrogen response element in mouse pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393(4):603-608.
- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De la Vega-Beltrán JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 2003; 278(9):7001-7009.
- Demott RP, Suárez SS. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 1992; 46(5):779-785.

- Desroziers E, Mikkelsen J, Simonneaux V, Keller M, Tillet Y, Caraty A, Franceschini I. Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *J Neuroendocrinol* 2010; 22(10):1101-1112.
- Douglas FL, Palkovits M, Brownstein MJ. Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in the lower brainstem of the rat. *Brain Res* 1982; 245(2):376-378.
- Dym M. Spermatogonial cells of the testis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; 91(24):11287-11289.
- Dym M, Fawcett W. Further observations on the number of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod* 1971; 4:195-215.
- Eickhoff R, Baldauf C, Koyro HW, Wennmuth G, Suga Y, Seitz J, Henkel R, Meinhardt A. Influence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) on the zinc content and redox state of protein-bound sulphhydryl groups in rat sperm: indications for a new role of MIF in sperm maturation. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(8):605-611.
- Eisenbach M, Giojalas LC. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(4):276-285.
- Eisenbach M, Tur-Kaspa I. Do human eggs attract spermatozoa? *Bioessays* 1999; 21(3):203-210.
- Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Verdoodt M, Englert Y. Increased sperm motility after in-vitro culture of testicular biopsies from obstructive azoospermic patients results in better post-thaw recovery rate. *Hum Reprod* 2000; 15(11):2371-2374.
- Emson PC, Arregui A, Clement-Jones V, Sandberg BE, Rossor M. Regional distribution of methionine-enkephalin and substance P-like immunoreactivity in normal human brain and Huntington's disease. *Brain Res* 1980; 199(1):147-160.
- Erspamer V. Ricerche preliminary sulla moschatina. *Experientia* 1949; 5:79-81.
- Erspamer V, Anastasi A, Bertaccini G, Cei JM. Structure and pharmacological actions of physalaemin, the main active polypeptide of the skin of *Physalaemus fuscomaculatus*. *Experientia* 1964; 20(9):489-490.
- Escoffier J, Krapf D, Navarrete F, Darszon A, Visconti PE. Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 2):473-485.
- Escoffier J, Navarrete F, Haddad D, Santi CM, Darszon A, Visconti PE. Flow cytometry analysis reveals that only a subpopulation of mouse sperm undergoes hyperpolarization during capacitation. *Biol Reprod* 2015; 92(5):121.
- Espinosa F, Darszon A. Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca^{2+} . *FEBS Lett* 1995; 372(1):119-125.

- Espósito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, Van Duin M, Conti M, Gossen JA. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(9):2993-2998.
- Estrada KM, Clay CM, Pompolo S, Smith JT, Clarke IJ. Elevated KiSS-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/lutenising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback. *J Neuroendocrinol* 2006; 18(10):806-809.
- Evans BJ, Wang Z, Mobley L, Khosravi D, Fujii N, Navenot JM, Peiper SC. Physical association of GPR54 C-terminal with protein phosphatase 2A. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377(4):1067-1071.
- Fabro G, Rovasio RA, Civalero S, Frenkel A, Caplan SR, Eisenbach M, Giojalas LC. Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biol Reprod* 2002; 67(5):1565-1571.
- Félix R, Sandoval A, Sánchez D, Gómora JC, De la Vega-Beltrán JL, Treviño CL, Darszon A. ZD7288 inhibits low-threshold Ca(2+) channel activity and regulates sperm function. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311(1):187-192.
- Fénichel P, Hsi BL, Farahifar D, Donzeau M, Barrier-Delpech D, Yehy CJ. Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence-activated cell sorter. *J Reprod Fertil* 1989; 87(2):699-706.
- Fernández D, Valdivia A, Irazusta J, Ochoa C, Casis L. Peptidase activities in human semen. *Peptides* 2002; 23(3):461-468.
- Ferramosca A, Zara V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Biomed Res Int* 2014; 2014:902953.
- Ficarro S, Chertihin O, Westbrook VA, White F, Jayes F, Kalab P, Marto JA, Shabanowitz J, Herr JC, Hunt DF, Visconti PE. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J Biol Chem* 2003; 278(13):11579-11589.
- Fisch JD, Behr B, Conti M. Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors. *Hum Reprod* 1998; 13(5):1248-1254.
- Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, Van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 19):3543-3555.
- Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1469(3):197-235.

- Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Li C and O'Toole CM. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod* 1998; 59(1):12-16.
- Florman HM, Corron ME, Kim TD, Babcock DF. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 1992; 152(2):304-314.
- Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* 2006; 401(3):225-230.
- Franklin LE. Formation of the redundant nuclear envelope in monkey spermatids. *Anat Rec* 1968; 161(2):149-161.
- Fraser LR. The "switching on" of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Mol Reprod Dev* 2010; 77(3):197-208.
- Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K. Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 1995; 40(2):233-241.
- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa SA, Baxendale RW. First messenger regulation of capacitation via G protein-coupled mechanisms: a tale of serendipity and discovery. *Mol Hum Reprod* 2003; 9(12):739-748.
- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale RW, Mededovic S, Osiguwa OO. First messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP. *J Reprod Dev* 2005; 51(1):37-46.
- Fritsch HA, Van Noorden S, Pearse AG. Localization of somatostatin-, substance P- and calcitonin-like immunoreactivity in the neural ganglion of *Ciona intestinalis* L (Ascidacea). *Cell Tissue Res* 1979; 202(2):263-274.
- Fritsch HA, Van Noorden S, Pearse AG. Substance P-, neurotensin- and bombesin-like immunoreactivities in the gill epithelium of *Ciona intestinalis* L. *Cell Tissue Res* 1980; 208(3):467-473.
- Fujihara Y, Murakami M, Inoue N, Satouh Y, Kaseda K, Ikawa M, Okabe M. Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 9):1531-1536.
- Fujinoki M, Kawamura T, Toda T, Ohtake H, Ishimoda-Takagi T, Shimizu N, Yamaoka S, Okuno M. Identification of 36kDa phosphoprotein in fibrous sheath of hamster spermatozoa. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004; 137(4):509-520.
- Fujinoki M, Kawamura T, Toda T, Ohtake H, Shimizu N, Yamaoka S, Okuno M. Identification of the 58-kDa phosphoprotein associated with motility initiation of hamster spermatozoa. *J Biochem* 2003; 134(4):559-565.
- Fukuda N, Yomogida K, Okabe M, Touhara K. Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing

- and in regulation of sperm motility. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 24):5835-5845.
- Funahashi H, Asano A, Fujiwara T, Nagai T, Niwa K, Fraser LR. Both fertilization promoting peptide and adenosine stimulate capacitation but inhibit spontaneous acrosome loss in ejaculated boar spermatozoa in vitro. *Mol Reprod Dev* 2000; 55(1):117-124.
- Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312(4):1357-1363.
- Gadella BM, Harrison RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 2000; 127(11):2407-2420.
- Gadella BM, Harrison RA. Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 2002; 67(1):340-350.
- Gadella BM, Luna C. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology* 2014; 81(1):74-84.
- Gadella BM, Miller NGA, Colenbrander B, Van Golde LGM, Harrison RAP. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Mol Reprod Dev* 1999; 53(1):108-125.
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int J Dev Biol* 2008; 52(5-6):473-480.
- Gadella BM, Visconti PE. Regulation of capacitation. In: The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration. Cambridge University Press 2006 pp. 134-169.
- Gaddum-Rosse P. Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. *Am J Anat* 1981; 160(3):333-341.
- Gagnon C, White D, Cosson J, Huitorel P, Eddé B, Desbruyères E, Paturle-Lafanechère L, Multigner L, Job D, Cibert C. The pyglutamylated lateral chain of alpha-tubulin plays a key role in flagellar motility. *J Cell Sci* 1996; 109(Pt 6):1545-1553.
- Gagnon C, White D, Huitorel P, Cosson J. A monoclonal antibody against the dynein IC1 peptide of sea urchin spermatozoa inhibits the motility of sea urchin, dinoflagellate, and human flagellar axonemes. *Mol Biol Cell* 1994; 5(9):1051-1063.
- Galantino-Homer HL, Florman HM, Storey BT, Dobrinski I, Kopf GS. Bovine sperm capacitation: assessment of phosphodiesterase activity and intracellular alkalinization on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev* 2004; 67(4):487-500.

- Gangwar DK, Atreja SK. Signalling Events and Associated Pathways Related to the Mammalian Sperm Capacitation. *Reprod Domest Anim* 2015; 50(5):705-711.
- Gao Z, Garbers DL. Species diversity in the structure of zonadhesin, a sperm-specific membrane protein containing multiple cell adhesion molecule-like domains. *J Biol Chem* 1998; 273(6):3415-3421.
- García MA, Meizel S. Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na⁺/H⁺ exchanger. *Mol. Reprod. Dev* 1999; 52(2):189-195.
- García-Galiano D, Van Ingen Schenau D, León S, Krajnc-Franken MA, Manfredi-Lozano M, Romero-Ruiz A, Navarro VM, Gaytán F, Van Noort PI, Pinilla L, Blumenröhr M, Tena-Sempere M. Kisspeptin signaling is indispensable for neurokinin B, but not glutamate, stimulation of gonadotropin secretion in mice. *Endocrinology* 2012; 153(1):316-328.
- García-Herrero S, Meseguer M, Martínez-Conejero JA, Remohí J, Pellicer A, Garrido N. The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. *Fertil Steril* 2010; 94(4):1360-1373.
- García-Ortega J, Pinto FM, Fernández-Sánchez M, Prados N, Cejudo-Román A, Almeida TA, Hernández M, Romero M, Tena-Sempere M, Cadenas L. Expression of neurokinin B/NK3 receptor and kisspeptin/KISS1 receptor in human granulosa cells. *Hum Reprod* 2014; 29(12):2736-2746.
- García-Ortega J, Pinto FM, Prados N, Bello AR, Almeida TA, Fernández-Sánchez M, Cadenas L. Expression of Tachykinins and Tachykinin Receptors and Interaction with Kisspeptin in Human Granulosa and Cumulus Cells. *Biol Reprod* 2016; 94(6):124.
- Garty N, Salomon Y. Stimulation of partially purified adenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate. *FEBS Lett* 1987; 218(1):148-152.
- Gaskins GT, Glanowska KM, Moenter SM. Activation of neurokinin 3 receptors stimulates GnRH release in a location-dependent but kisspeptin-independent manner in adult mice. *Endocrinology* 2013; 154(11):3984-3989.
- Gatica LV, Guidobaldi HA, Montesinos MM, Teves ME, Moreno AI, Uñates DR, Molina RI, Giojalas LC. Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile samples. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(9):559-569.
- Gaytán F, Gaytán M, Castellano JM, Romero M, Roa J, Aparicio B, Garrido N, Sánchez-Criado JE, Millar RP, Pellicer A, Fraser HM, Tena-Sempere M. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296(3):E520-531.
- Gaytán M, Castellano JM, Roa J, Sánchez-Criado JE, Tena-Sempere M, Gaytán F. Expression of KiSS-1 in rat oviduct: possible involvement in

- prevention of ectopic implantation? *Cell Tissue Res* 2007; 329(3):571-579.
- Gerard NP, Bao L, Xiao-Ping H, Gerard C. Molecular aspects of the tachykinin receptors. *Regul Pept* 1993; 43(1-2):21-35.
- Ghaddar G, Ruchon AF, Carpentier M, Marcinkiewicz M, Seidah NG, Crine P, Desgroseillers L, Boileau G. Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metalloproteinase of the neprilysin family. *Biochem J* 2000; 347(Pt 2):419-429.
- Gianzo M, Muñoz-Hoyos I, Urizar-Arenaza I, Larreategui Z, Quintana F, Garrido N, Subirán N, Irazusta J. Angiotensin II type 2 receptor is expressed in human sperm cells and is involved in sperm motility. *Fertil Steril* 2016; 105(3):608-616.
- Gilbert SF. *Developmental Biology*, 7^a ed., Sinauer Associates, Massachusetts, 2003.
- Gillespie E, Leeman SE, Watts LA, Coukos JA, O'Brien MJ, Cerda SR, Farraye FA, Stucchi AF, Becker JM. Truncated neurokinin-1 receptor is increased in colonic epithelial cells from patients with colitis-associated cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(42):17420-17425.
- Gingras D, White D, Garin J, Cosson J, Huitorel P, Zingg H, Cibert C, Gagnon C. Molecular cloning and characterization of a radial spoke head protein of sea urchin sperm axonemes: involvement of the protein in the regulation of sperm motility. *Mol Biol Cell* 1998; 9(2):513-522.
- Gingras D, White D, Garin J, Multigner L, Job D, Cosson J, Huitorel P, Zingg H, Dumas F, Gagnon C. Purification, cloning, and sequence analysis of a Mr = 30,000 protein from sea urchin axonemes that is important for sperm motility. Relationship of the protein to a dynein light chain. *J Biol Chem* 1996; 271(22):12807-12813.
- Glidewell-Kenney CA, Shao PP, Iyer AK, Grove AM, Meadows JD, Mellon PL. Neurokinin B causes acute GnRH secretion and repression of GnRH transcription in GT1-7 GnRH neurons. *Mol Endocrinol* 2013; 27(3):437-454.
- Gnessi L, Ruff MR, Fraioli F, Pert CB. Demonstration of receptor-mediated chemotaxis by human spermatozoa. A novel quantitative bioassay. *Exp Cell Res* 1985; 161(1):219-230.
- Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 1985; 32(1):145-153.
- González-Santana A, Marrero-Hernández S, Dorta I, Hernández M, Pinto FM, Báez D, Bello AR, Candelas L, Almeida TA. Altered expression of the tachykinins substance P/neurokinin A/hemokinin-1 and their preferred neurokinin 1/neurokinin 2 receptors in uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 2016; 106(6):1521-1529.
- Goodman RL, Coolen LM, Anderson GM, Hardy SL, Valent M, Connors JM, Fitzgerald ME, Lehman MN. Evidence that dynorphin plays a major

- role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology* 2004; 145(6):2959-2967.
- Goodman RL, Coolen LM, Lehman MN. A role for neurokinin B in pulsatile GnRH secretion in the ewe. *Neuroendocrinology* 2014; 99(1):18-32.
- Goodman RL, Hileman SM, Nestor CC, Porter KL, Connors JM, Hardy SL, Millar RP, Cernea M, Coolen LM, Lehman MN. Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin act in the arcuate nucleus to control activity of the GnRH pulse generator in ewes. *Endocrinology* 2013; 154(11):4259-4269.
- Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 2007; 148(12):5752-5760.
- Goodwin LO, Leeds NB, Hurley I, Mandel FS, Pergolizzi RG, Benoff S. Isolation and characterization of the primary structure of testis-specific L-type calcium channel: implications for contraception. *Mol Hum Reprod* 1997; 3(3):255-268.
- Gottsch ML, Popa SM, Lawhorn JK, Qiu J, Tonsfeldt KJ, Bosch MA, Kelly MJ, Rønnekleiv OK, Sanz E, McKnight GS, Clifton DK, Palmiter RD, Steiner RA. Molecular properties of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *Endocrinology* 2011; 152(11):4298-4309.
- Goubillon ML, Forsdike RA, Robinson JE, Ciofi P, Caraty A, Herbison AE. Identification of neurokinin B-expressing neurons as an highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *Endocrinology* 2000; 141(11):4218-4225.
- Grachev P, Li XF, Kinsey-Jones JS, Di Domenico AL, Millar RP, Lightman SL, O'Byrne KT. Suppression of the GnRH pulse generator by neurokinin B involves a κ -opioid receptor-dependent mechanism. *Endocrinology* 2012; 153(10):4894-4904.
- Grachev P, Millar RP, O'Byrne KT. The role of neurokinin B signalling in reproductive neuroendocrinology. *Neuroendocrinology* 2014; 99(1):7-17.
- Grimmelikhuijzen CJ, Balfe A, Emson PC, Powell D, Sundler F. Substance P-like immunoreactivity in the nervous system of hydra. *Histochemistry* 1981; 71(3):325-333.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260(6):3440-3450.
- Guidobaldi HA, Teves ME, Uñates DR, Anastasia A, Giojalas LC. Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS One* 2008; 3(8):e3040.
- Gur Y, Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Gene Dev* 2006; 20(4):411-416.

- Guraya SS. The comparative cell biology of accessory somatic (or Sertoli) cells in the animal testis. *Int Rev Cytol* 1995; 160:163-220.
- Gutiérrez-Pascual E, Martínez-Fuentes AJ, Pinilla L, Tena-Sempere M, Malagón MM, Castaño JP. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol* 2007; 19(7):521-530.
- Gwathmey TM, Ignatz GG, Suárez SS. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 2003; 69(3):809-815.
- Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:145-174.
- Hao J, Chen M, Ji S, Wang X, Wang Y, Huang X, Yang L, Wang Y, Cui X, Lv L, Liu Y, Gao F. Equatorin is not essential for acrosome biogenesis but is required for the acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 444(4):537-542.
- Harmar AJ, Hyde V, Chapman K. Identification and cDNA sequence of delta-preprotachykinin, a fourth splicing variant of the rat substance P precursor. *FEBS Lett* 1990; 275(1-2):22-24.
- Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of $[Ca(2+)](i)$ oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J Biol Chem* 2004; 279(44):46315-46325.
- Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ, Kirkman-Brown JC. Kinetics of the progesterone-induced acrosome reaction and its to intracellular calcium responses in individual human spermatozoa. *Biol Reprod* 2006; 75(6):933-939.
- Harper CV, Cummerison JA, White MRH, Publicover SJ, Johnson PM. Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 13):2130-2135.
- Harrison RA. Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol Reprod Dev* 2004; 67(3):337-352.
- Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. Bicarbonate/ CO_2 , an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 1996; 45(3):378-391.
- Harrison RA, Gadella BM. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 2005; 63(2):342-351.
- Harrison RA, Miller NG. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 2000; 55(2):220-228.
- Hasuwa H, Muro Y, Ikawa M, Kato N, Tsujimoto Y, Okabe M. Transgenic mouse sperm that have green acrosome and red mitochondria allow

- visualization of sperm and their acrosome reaction in vivo. *Exp Anim* 2010; 59(1):105-107.
- Henkel RR, Defosse K, Koyro HW, Weissmann N, Schill WB. Estimate of oxygen consumption and intracellular zinc concentration of human spermatozoa in relation to motility. *Asian J Androl* 2003; 5(1):3-8.
- Herbison AE, de Tassigny Xd, Doran J, Colledge WH. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2010; 151(1):312-321.
- Hernández-González EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, López-González I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A, Visconti PE. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem* 2006; 281(9):5623-5633.
- Hernández-González EO, Treviño CL, Castellano LE, De la Vega-Beltrán JL, Ocampo AY, Wertheimer E, Visconti PE, Darszon A. Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 2007; 282(33):24397-24406.
- Herrero MB, De Lamirande E, Gagnon C. Tyrosine nitration in human spermatozoa: a physiological function of peroxynitrite, the reaction product of nitric oxide and superoxide. *Mol Hum Reprod* 2001; 7(10):913-921.
- Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suárez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J, Moss SB. The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* 2005; 9(2):249-259.
- Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J, Serres C, Kahrizi K, Najmabadi H, Beckmann JS, Smith RJ. Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet* 2010; 18(11):1178-1184.
- Hirohashi N, Gerton GL, Buffone MG. Video imaging of the sperm acrosome reaction during in vitro fertilization. *Commun Integr Biol* 2011; 4(4):471-476.
- Hirohashi N, Spina FA, Romarowski A, Buffone MG. Redistribution of the intra-acrosomal EGFP before acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Reproduction* 2015; 149(6):657-663.
- Ho HC, Granish KA, Suárez SS. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev Biol* 2002; 250(1):208-217.
- Ho HC, Suárez SS. An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca²⁺ store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biol Reprod* 2001b; 65(5):1606-1615.
- Ho HC, Suárez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 2001a; 122(4):519-526.

- Ho HC, Suárez SS. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* 2003; 68(5):1590-1596.
- Ho HC, Wey S. Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis. *Microsc Res Tech* 2007; 70(8):719-723.
- Ho K, Wolff CA, Suárez SS. CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21(2):345-350.
- Hogan B. Decisions, decisions! *Nature* 2002; 418(6895):282-283.
- Holdcraft RW, Braun RE. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 2004; 27(6):335-342.
- Holmgren S, Jensen J. Evolution of vertebrate neuropeptides. *Brain Res Bull.* 2001; 55(6):723-735.
- Holt WV, Harrison RA. Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. *J Androl* 2002; 23(4):557-565.
- Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988; 24(3):739-768.
- Hoshi K, Aita T, Yanagida K, Yoshimatsu N, Sato A. Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relationship with capacitation. *Hum Reprod* 1990; 5(1):71-74.
- Houston B, Curry B, Aitken RJ. Human spermatozoa possess an IL4I1 l-amino acid oxidase with a potential role in sperm function. *Reproduction* 2015; 149(6):587-596.
- Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller E, Caraty A, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillon WS, Liposits Z, Kallo I. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci* 2010; 31(11):1984-1998.
- Hsu MC, Wang JY, Lee YJ, Jong DS, Tsui KH, Chiu CH. Kisspeptin modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa. *Reproduction* 2014; 147(6):835-845.
- Huang Z, Vijayaraghavan S. Increased phosphorylation of a distinct subcellular pool of protein phosphatase, PP1 γ 2, during epididymal sperm maturation. *Biol Reprod* 2004; 70(2):439-447.
- Huma T, Ulla F, Hanif F, D.Rizak J, Shahab M. Peripheral administration of kisspeptin antagonist does not alter basal plasma testosterone but decreases plasma adiponectin levels in adult male rhesus macaques. *Turk J Biol* 2014; 38:450-456.

- Hunter RHF. Periovalutary physiology of the oviduct, with special reference to progression, storage and capacitation of spermatozoa. In: New horizons in sperm cell research. Japan Sci Soc Press, Tokyo/Gordon and Breach Sci Publ 1987 pp.31-45.
- Ignotz GG, Cho MY, Suárez SS. Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biol Reprod* 2007; 77(6):906-913.
- Ignotz GG, Suárez SS. Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembranated bovine sperm. *Biol Reprod* 2005; 73(3):519-526.
- Iijima N, Takumi K, Sawai N, Ozawa H. An immunohistochemical study on the expressional dynamics of kisspeptin neurons relevant to GnRH neurons using a newly developed anti-kisspeptin antibody. *J Mol Neurosci* 2011; 43(2):146-154.
- Ikeda K, Emoto N, Raharjo SB, Nurhantari Y, Saiki K, Yokoyama M, Matsuo M. Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides. *J Biol Chem* 1999; 274(45):32469-32477.
- Inaba K. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog Sci* 2003; 20(9):1043-1056.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; 434(7030):234-238.
- Inoue N, Ikawa M, Nakanishi T, Matsumoto M, Nomura M, Seya T, Okabe M. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol Cell Biol* 2003; 23(7):2614-2622.
- Inoue N, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M, Yanagimachi R. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(50):20008-20011.
- Irfan S, Ehmcke J, Wahab F, Shahab M, Schlatt S. Intratesticular action of kisspeptin in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Andrologia* 2014; 46(6):610-617.
- Isobe T, Minoura H, Tanaka K, Shibahara T, Hayashi N, Toyoda N. The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum Reprod* 2002; 17(6):1441-1446.
- Ito J, Parrington J, Fissore RA. PLC ζ and its role as a trigger of development in vertebrates. *Mol Reprod Dev* 2011; 78(10-11):846-853.
- Izumi S, Makino T, Iizuka R. Immunoreactive luteinizing hormone-releasing hormone in the seminal plasma and human semen parameters. *Fertil Steril* 1985; 43(4):617-620.

- Jaiswal BS, Conti M. Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(19):10676-10681.
- Jamil K, White IG. Induction of acrosomal reaction in sperm with ionophore A23187 and calcium. *Arch Androl* 1981; 7(4):283-292.
- Jarry H, Meyer B, Holzappel G, Hinney B, Kuhn W, Wuttke W. Angiotensin II/III and substance P in human follicular fluid obtained during IVF: relation of the peptide content with follicular size. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 119(2):277-282.
- Jeon BG, Moon JS, Kim KC, Lee HJ, Choe SY, Rho GJ. Follicular fluid enhances sperm attraction and its motility in human. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18(8):407-412.
- Jiménez-González C, Michelangeli F, Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ. Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Hum Reprod Update* 2006; 12(3):253-267.
- Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, Yan W. Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biol Reprod* 2007; 77(1):37-44.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(12):4892-4896.
- Jockenhövel F, Fingscheidt U, Khan SA, behre HM, Nieschlag E. Bio and immune-activity of FSH in serum after intramuscular injection of highly purified urinary human FSH in normal men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990; 33(5):573-584.
- Johnson KJ, Boekelheide K. Dynamic testicular adhesion junctions are immunologically unique. I. Localization of p120 catenin in rat testis. *Biol Reprod* 2002; 66(4):983-991.
- Johnson LR, Foster JA, Haig-Ladewig L, VanScoy H, Rubin CS, Moss SB, Gerton GL. Assembly of AKAP82, a protein kinase A anchor protein, into the fibrous sheath of mouse sperm. *Dev Biol* 1997; 192(2):340-350.
- Jones R, Howes E, Dunne PD, James P, Bruckbauer A, Klenerman D. Tracking diffusion of GM1 gangliosides and zona pellucida binding molecules in sperm plasma membranes following cholesterol efflux. *Dev Biol* 2010; 339(2):398-406.
- Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979; 31(5):531-537.
- Jonsson M, Linse S, Frohm B, Lundwall A, Malm J. Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. *Biochem J* 2005; 387(Pt2):447-453.

- Kage R, McGregor GP, Thim L, Conlon JM. Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin. *J Neurochem* 1988; 50(5):1412-1417.
- Kaiser UB, Kuohung W. KiSS-1 and GPR54 as new players in gonadotropin regulation and puberty. *Endocrine* 2005; 26(3):277-284.
- Kalab P, Peknicová J, Geussová G, Moos J. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 1998; 51(3):304-314.
- Kanazawa I, Jessell T. Post mortem changes and regional distribution of substance P in the rat and mouse nervous system. *Brain Res* 1976; 117(2):362-367.
- Kanazawa I, Ogawa T, Kimura S, Munekata E. Regional distribution of substance P, neurokinin α and neurokinin β in rat central nervous system. *Neurosci Res* 1984; 2(1-2):111-120.
- Kanchev LN, Konakchieva R, Angelova PA, Davidoff MS. Substance P modulating effect on the binding capacity of hamster Leydig cell LH receptors. *Life Sci* 1995; 56(19):1631-1637.
- Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 114(2):533-540.
- Kato Y, Shoei S, Nagao Y. Capacitation status of activated bovine sperm cultured in media containing methyl- β -cyclodextrin affects the acrosome reaction and fertility. *Zygote* 2010; 19(1):21-30.
- Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 2007; 148(4):1774-1783.
- Kaupp UB, Kashikar ND, Weyand I. Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu Rev Physiol* 2008; 70:93-117.
- Kaupp UB, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 2002; 82(3):769-824.
- Kawaguchi Y, Hoshimaru M, Nawa H, Nakanishi S. Sequence analysis of cloned cDNA for rat substance P precursor: existence of a third substance P precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 139(3):1040-1046.
- Kelly RW. Immunomodulators in human seminal plasma: a vital protection for spermatozoa in the presence of infection? *Int J Androl* 1999; 22(1):2-12.
- Kerdelhué B, Lenoir V, Kolm P, Seltman HJ, Jones HW Jr, Jones GS. ACTH, beta-endorphin, substance P, and corticotrophin releasing hormone in plasma and follicular fluid in hormonally stimulated menstrual cycles for in-vitro fertilization in the human. *Hum Reprod* 1997; 12(2):231-235.

- Killian GJ. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* 2004; 82:83:141-153.
- Kim KS, Foster JA, Gerton GL. Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biol Reprod* 2001; 64(1):148-156.
- Kimura M, Kim E, Kang W, Yamashita M, Saigo M, Yamazaki T, Nakanishi T, Kashiwabara S, Baba T. Functional roles of mouse sperm hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in fertilization. *Biol Reprod* 2009; 81(5):939-947.
- Kimura S, Goto K, Ogawa T, Sugita Y, Kanazawa I. Pharmacological characterization of novel mammalian tachykinins, neurokinin α and neurokinin β . *Neurosci Res* 1984; 2(1-2):97-104.
- Kimura S, Okada M, Sugita Y, Kanazawa I, Munekata E. Novel neuropeptides neurokinin a and b, isolated from porcine spinal cord. *Proc Jpn Acad B* 1983; 59:101-104.
- Kinsey-Jones JS, Grachev P, Li XF, Lin YS, Milligan SR, Lightman SL, O'Byrne KT. The inhibitory effects of neurokinin B on GnRH pulse generator frequency in the female rat. *Endocrinology* 2012; 153(1):307-315.
- Kirichok Y, Lishko PV. Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol Hum Reprod* 2011; 17(8):478-499.
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature* 2006; 439(7077):737-740.
- Kirkman-Brown JC, Punt EL, Barratt CL, Publicover SJ. Zona pellucida and progesterone-induced Ca^{2+} signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl* 2002; 23(3):306-315.
- Klassert TE, Pinto F, Hernández M, Cadenas ML, Hernández MC, Abreu J, Almeida TA. Differential expression of neurokinin B and hemokinin-1 in human immune cells. *J Neuroimmunol* 2008; 196(1-2):27-34.
- Knott JG, Kurokawa M, Fissore RA, Schultz RM, Williams CJ. Transgenic RNA interference reveals role for mouse sperm phospholipase C ζ in triggering Ca^{2+} oscillations during fertilization. *Biol Reprod* 2005; 72(4):992-996.
- Kongmanas K, Kruevaisayawan H, Saewu A, Sugeng C, Fernandes J, Souda P, Angel JB, Faull KF, Aitken RJ, Whitelegge J, Hardy D, Berger T, Baker MA, Tanphaichitr N. Proteomic characterization of pig sperm anterior head plasma membrane reveals roles of acrosomal proteins in ZP3 binding. *J Cell Physiol* 2015; 230(2):449-463.
- Koopman, G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, Van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84(5):1415-1420.

- Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(8):3199-3207.
- Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J* 2011; 436(3):687-698.
- Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suárez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276(37):34631-34636.
- Kovac JR, Chrones T, Preiksaitis HG, Sims SM. Tachykinin receptor expression and function in human esophageal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318(2):513-520.
- Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE. Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol* 2005; 489(3):372-386.
- Krajewski SJ, Burke MC, Anderson MJ, McMullen NT, Rance NE. Forebrain projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat. *Neuroscience* 2010; 166(2):680-697.
- Krapf D, Arcelay E, Wertheimer EV, Sanjay A, Pilder SH, Salicioni AM, Visconti PE. Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J Biol Chem* 2010; 285(11):7977-7985.
- Krasznai Z, Krasznai ZT, Morisawa M, Bazsáné ZK, Hernádi Z, Fazekas Z, Trón L, Goda K, Márián T. Role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in calcium homeostasis and human sperm motility regulation. *Cell Motil Cytoskeleton* 2006; 63(2):66-76.
- Kulkarni SA, Garde SV, Sheth AR. Immunocytochemical localization of bioregulatory peptides in marmoset testes. *Arch Androl* 1992; 29(1):87-102.
- Kurtz MM, Wang R, Clements MK, Cascieri MA, Austin CP, Cunningham BR, Chicchi GG, Liu Q. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene* 2002; 296(1-2):205-212.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-685.
- Lai JP, Ho WZ, Kilpatrick LE, Wang X, Tuluc F, Korchak HM, Douglas SD. Full-length and truncated neurokinin-1 receptor expression and function during monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(20):7771-7776.

- Lanfranco F, Gromoll J, Von Eckardstein S, Herding EM, Nieschlag E, Simoni M. Role of sequence variations of the GnRH receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* 2005; 153(6):845-852.
- Langlais J, Kan FW, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res* 1988; 20(2):185-201.
- Langlais J, Zollinger M, Plante L, Chapdelaine A, Bleau G, Roberts KD. Localization of cholesterol sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(12):7266-7270.
- Langman J. Medical Embriology, 4^a ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1981.
- Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan YM, Mahan A, Cerrato F, Le WW, Hoffman GE, Seminara SB. Kiss1-/- mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54-/- mice. *Endocrinology* 2007; 148(10):4927-4936.
- Lawson C, Goupil S, Leclerc P. Increased activity of the human sperm tyrosine kinase SRC by the cAMP-dependent pathway in the presence of calcium. *Biol Reprod* 2008; 79(4):657-666.
- Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 1999; 13(4):424-436.
- Lax Y, Rubinstein S, Breitbart H. Subcellular distribution of protein kinase C alpha and betaI in bovine spermatozoa, and their regulation by calcium and phorbol esters. *Biol Reprod* 1997; 56(2):454-459.
- Lecat S, Bucher B, Mely Y, Galzi JL. Mutations in the extracellular amino-terminal domain of the NK2 neurokinin receptor abolish cAMP signaling but preserve intracellular calcium responses. *J Biol Chem* 2002; 277(44):42034-42048.
- Lecci A, Maggi CA. Tachykinins as modulators of the micturition reflex in the central and peripheral nervous system. *Regul Pept* 2001; 101(1-3):1-18.
- Leclerc P, De Lamirande E, Gagnon C. Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 1996; 55(3):684-692.
- Lee CY, Ho J, Chow SN, Yasojima K, Schwab C, McGeer PL. Immunoidentification of gonadotropin releasing hormone receptor in human sperm, pituitary and cancer cells. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44(3):170-177.

- Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 1999; 446(1):103-107.
- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(23):1731-1737.
- Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* 1997; 57(12):2384-2387.
- Lefievre L, De Lamirande E, Gagnon C. Presence of cyclic nucleotide phosphodiesterases PDE1A, existing as a stable complex with calmodulin, and PDE3A in human spermatozoa. *Biol Reprod* 2002; 67(2):423-430.
- Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2010; 151(8):3479-3489.
- Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, Rao CV. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 2001; 15(1):184-200.
- Lembeck F, Bernatzky G, Gamse R, Saria A. Characterization of substance P-like immunoreactivity in submammalian species by high performance liquid chromatography. *Peptides* 1985; 6 Suppl 3:231-236.
- Lembeck F, Holzer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunym Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1979; 310(2):175-183.
- Leonard S, Kurzrok R. Inhibitors of hyaluronidase in blood sera and their effect on follicle cell dispersal. *Endocrinology* 1946; 39:85-90.
- Levine N, Marsh DJ. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *J Physiol* 1971; 213(3):557-570.
- Li YF, He W, Kim YH, Mandal A, Digilio L, Klotz K, Flickinger CJ, Herr JC. CABYR isoforms expressed in late steps of spermiogenesis bind with AKAPs and ropporin in mouse sperm fibrous sheath. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8:101.
- Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* 2010; 140(3):327-337.
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature* 2011; 471(7338):387-391.
- Lishko PV, Kirichok Y. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol* 2010; 588(Pt 23):4667-4672.

- Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung JJ, Clapham DE. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol* 2012; 74:453-475.
- Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR. Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem* 2003; 278(18):15922-15926.
- Liu J, Xia J, Cho KH, Clapham DE, Ren D. CatSper β , a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *J Biol Chem* 2007; 282(26):18945-18952.
- Liu X, Lee K, Herbison AE. Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology* 2008; 149(9):4605-4614.
- Lobley A, Pierron V, Reynolds L, Allen L, Michalovich D. Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterization of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:53.
- Lu Q, Breitbart QY, Chen DY. Expression and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases during spermatogenesis and epididymal sperm maturation in mice. *Arch Androl* 1999; 43(1):55-66.
- Luan X, Zhou Y, Wang W, Yu H, Li P, Gan X, Wei D, Xiao J. Association study of the polymorphisms in the KISS1 gene with central precocious puberty in Chinese girls. *Eur J Endocrinol* 2007; 157(1):113-118.
- Lucchesi O, Ruete MC, Bustos MA, Quevedo MF, Tomes CN. The signaling module cAMP/Epac/Rap1/PLC ϵ /IP3 mobilizes acrosomal calcium during sperm exocytosis. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863(4):544-561.
- Lundbaek JA, Andersen OS. Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *J Gen Physiol* 1994; 104(4):645-673.
- Lv ZM, Wang M, Xu C. Antifertility characteristics of the N-terminal region of mouse equatorial segment protein. *Anat Rec (Hoboken)* 2010; 293(1):171-181.
- Mackie AR, James PS, Ladha S, Jones R. Diffusion barriers in ram and boar sperm plasma membranes: directionality of lipid diffusion across the posterior ring. *Biol Reprod* 2001; 64(1):113-119.
- Maggi CA. The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol* 1995; 26(5):911-944.
- Maggi CA. Principles of tachykininergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. *Regul Pept* 2000; 93(1-3):53-64.
- Maghni K, Michoud MC, Alles M, Rubin A, Govindaraju V, Meloche C, Martin JG. Airway smooth muscle cells express functional neurokinin-1 receptors and the nerve-derived preprotachykinin-A gene: regulation by passive sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(1):103-110.

- Magraner J, Morcillo E, Ausina P, Pinto FM, Martín JD, Moreau J, Anselmi E, Barrachina MD, Cortijo J, Advenier C, Cadenas ML. Effects of Mn2+ on the responses induced by different spasmogens in the oestrogen-primed rat uterus. *Eur J Pharmacol* 1997; 326(2-3):211-222.
- Malfroy B, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Schofield PR. Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett* 1988; 229(1):206-210.
- Mandal A, Klotz KL, Shetty J, Jayes FL, Wolkowicz MJ, Bolling LC, Coonrod SA, Black MB, Diekman AB, Haystead TA, Flickinger CJ, Herr JC. SLLP1, a unique, intra-acrosomal, non-bacteriolytic, c lysozyme-like protein of human spermatozoa. *Biol Reprod* 2003; 68(5):1525-1537.
- Mantha AK, Chandrashekar IR, Baquer NZ, Cowsik SM. Three dimensional structure of mammalian tachykinin peptide neurokinin B bound to lipid micelles. *J Biomol Struct Dyn* 2004; 22(2):137-148.
- Márquez B, Ignatz G, Suárez SS. Contributions of extracellular and intracellular Ca2+ to regulation of sperm motility: Release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Dev Biol* 2007; 303(1):214-221.
- Márquez B, Suárez SS. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca2+ influx. *Biol Reprod* 2007; 76(4):660-665.
- Martín SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, Van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; 182(5):1545-1556.
- Martínez-López P, Santi CM, Treviño CL, Ocampo-Gutiérrez AY, Acevedo JJ, Alisio A, Salkoff LB, Darszon A. Mouse sperm K+ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381(2):204-209.
- Masui T, Doi R, Mori T, Toyoda E, Koizumi M, Kami K, Ito D, Peiper SC, Broach JR, Oishi S, Niida A, Fujii N, Imamura M. Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315(1):85-92.
- Matsuyama S, Ohkura S, Mogi K, Wakabayashi Y, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K, Ichikawa M, Okamura H. Morphological evidence for direct interaction between kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone neurons at the median eminence of the male goat: an immunoelectron microscopic study. *Neuroendocrinology* 2011; 94(4):323-332.
- McCauley TC, Buhi WC, Wu GM, Mao J, Caamano JN, Didion BA, Day BN. Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biol Reprod* 2003; 69(3):828-834.
- McLachlan RI. The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000; 14(3):345-362.

- McLaren A, Southee D. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol*, 1997; 187(1):107-113.
- Mehats C, Andersen CB, Filopanti M, Jin SL, Conti M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Tren Endocrinol Metab* 2002; 13(1):29-35.
- Mei H, Doran J, Kyle V, Yeo SH, Colledge WH. Does Kisspeptin Signaling have a Role in the Testes? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:198.
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 2003; 111(8):483-488.
- Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reprod Fertil* 1992; 95(3):755-763.
- Merchenthaler I, Maderdrut JL, O'Harte F, Conlon JM. Localization of neurokinin B in the central nervous system of the rat. *Peptides* 1992; 13(4):815-829.
- Middendorff R, Davidoff M, Holstein AF. Neuroendocrine marker substances in human Leydig cells--changes by disturbances of testicular function. *Andrologia* 1993; 25(5):257-262.
- Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault SD, Eddy EM, O'Brien DA. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-5, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(47):16501-16506.
- Miki K, Willis WD, Brown PR, Goulding EH, Fulcher KD, Eddy EM. Targeted disruption of the *Akap4* gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev Biol* 2002; 248(2):331-342.
- Miller D, Ostermeier GC. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? *Gynecol Obstet Fertil* 2006; 34(9):840-846.
- Miller MR, Mannowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, Hill RZ, Bautista DM, Kirichok Y, Lishko PV. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science* 2016; 352(6285):555-559.
- Miraglia E, Rullo ML, Bosia A, Massobrio M, Revelli A, Ghigo D. Stimulation of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway elicits human sperm chemotaxis in vitro. *Fertil Steril* 2007; 87(5):1059-1063.
- Mitchell LA, Nixon B, Baker MA, Aitken RJ. Investigation of the role of SRC in capacitation-associated tyrosine phosphorylation of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2008; 14(4):235-243.
- Mitra K, Rangaraj N, Shivaji S. Novelty of the pyruvate metabolic enzyme dihydrolipoamide dehydrogenase in spermatozoa: correlation of its localization, tyrosine phosphorylation, and activity during sperm capacitation. *J Biol Chem* 2005; 280(27):25743-25753.

- Moazamian R, Polhemus A, Connaughton H, Fraser B, Whiting S, Gharagozloo P, Aitken RJ. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Mol Hum Reprod* 2015; 21(6):502-515.
- Moos J, Peknicova J, Geussova G, Philimonenko V, Hozak P. Association of protein kinase A type I with detergent-resistant structures of mammalian sperm cells. *Mol Reprod Dev* 1998; 50(1):79-85.
- Morales CR, Ni X, Smith CE, Inagaki N, Hermo L. ABCA17 mediates sterol efflux from mouse sperm plasma membranes. *Histol Histopathol* 2012; 27(3):317-328.
- Morales P. Gonadotropin-releasing hormone increases ability of the spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Biol Reprod* 1998; 59(2):426-430.
- Moreno RD, Ramalho-Santos J, Sutovsky P, Chan EK, Schatten G. Vesicular traffic and Golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: implications for acrosome architecture. *Biol Reprod* 2000; 63(1):89-98.
- Mortimer ST. CASA--practical aspects. *J Androl* 2000; 21(4):515-524.
- Moseley FLC, Jha KN, Björndahl L, Brewis IA, Publicover SJ, Barratt CLR, Lefièvre L. Protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and progesterone-induced acrosome reaction are enhanced in IVF media: an effect that is not associated with an increase in protein kinase A activation. *Mol Human Reprod* 2005; 11(7):523-529.
- Moussaoui SM, Le Prado N, Bonici B, Faucher DC, Cuiné F, Laduron PM, Garret C. Distribution of neurokinin B in rat spinal cord and peripheral tissues: comparison with neurokinin A and substance P and effects of neonatal capsaicin treatment. *Neuroscience* 1992; 48(4):969-978.
- Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 2001; 276(31):28969-28975.
- Müller K, Pomorski T, Müller P, Zachowski A, Herrmann A. Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry* 1994; 33(33):9968-9974.
- Mullins KJ, Saacke RG. Study of the functional anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. *Anat Rec* 1989; 225(2):106-117.
- Muñoz-Garay C, De la Vega-Beltrán JL, Delgado R, Labarca P, Félix R, Darszon A. Inwardly rectifying K⁺ channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Dev Biol* 2001; 234(1):261-274.

- Nakanishi S. Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci* 1991; 14:123-136.
- Naor Z, Breitbart H. Protein kinase C and mammalian spermatozoa acrosome reaction. *Trends Endocrinol Metab* 1997; 8(9):337-342.
- Navarro B, Kirichok Y, Clapham DE. KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(18):7688-7692.
- Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, Pineda R, Ruiz-Pino F, Pinilla L, Clifton DK, Tena-Sempere M, Steiner RA. Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011b; 300(1):E202-10.
- Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Nogueiras R, Vázquez MJ, Barreiro ML, Magni P, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 2005; 146(1):156-163.
- Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 2009; 29(38):11859-11866.
- Navarro VM, Gottsch ML, Wu M, García-Galiano D, Hobbs SJ, Bosch MA, Pinilla L, Clifton DK, Dearth A, Ronnekleiv OK, Braun RE, Palmiter RD, Tena-Sempere M, Alreja M, Steiner RA. Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. *Endocrinology* 2011a; 152(11):4265-4275.
- Navenot JM, Fujii N, Peiper SC. KiSS1 metastasis suppressor gene product induces suppression of tyrosine kinase receptor signaling to Akt, tumor necrosis factor family ligand expression, and apoptosis. *Mol Pharmacol* 2009; 75(5):1074-1083.
- Nawa H, Kotani H, Nakanishi S. Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature* 1984; 312(5996):729-734.
- Neill JM, Olds-Clarke P. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrate that bicarbonate but not serum albumin is required. *Gamete Res* 1987; 18:121-140.
- Nestor CC, Briscoe AM, Davis SM, Valent M, Goodman RL, Hileman SM. Evidence of a role for kisspeptin and neurokinin B in puberty of female sheep. *Endocrinology* 2012; 153(6):2756-2765.
- Nishikawa T, Tomori Y, Yamashita S, Shimizu S. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by phospholipase A2 and several lysophospholipids: possible role of phospholipase A2 in noradrenaline release from cerebral cortical synaptosomes. *J Pharm Pharmacol* 1989; 41(7):450-458.

- Nixon B, Bielanowicz A, McLaughlin EA, Tanphaichitr N, Ensslin MA, Aitken RJ. Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa. *J Cell Physiol* 2008; 218(1):122-134.
- Nixon B, Mitchell LA, Anderson AL, McLaughlin EA, O'bryan MK, Aitken RJ. Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes. *J Cell Physiol* 2011; 226(10):2651-2665.
- Noblanc A, Damon-Soubeyrand C, Karrich B, Henry-Berger J, Cadet R, Saez F, Guiton R, Janny L, Pons-Rejraji H, Álvarez JG, Drevet JR, Kocer A. DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic Biol Med* 2013; 65:719-723.
- Nolan JP, Magargee SF, Posner RG, Hammerstedt RH. Flow cytometric analysis of transmembrane phospholipid movement in bull sperm. *Biochemistry* 1995; 34(12):3907-3915.
- Nolan MA, Babcock DF, Wennemuth G, Brown W, Burton KA, McKnight GS. Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(37):13483-13488.
- Noritake K, Suzuki J, Matsuoka T, Makino T, Ohnishi H, Shimomura K, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda K, Sanbuissho A. Testicular toxicity induced by a triple neurokinin receptor antagonist in male dogs. *Reprod Toxicol* 2011; 31(4):440-446.
- Ogawa T, Kanazawa I, Kimura S. Regional distribution of substance P, neurokinin α and neurokinin β in rat spinal cord, nerve roots and dorsal root ganglia, and the effects of dorsal root section or spinal transection. *Brain Res* 1985; 359(1-2):152-157.
- Ohno M, Sakumi K, Fukumura R, Furuichi M, Iwasaki Y, Hokama M, Ikemura T, Tsuzuki T, Gondo Y, Nakabeppu Y. 8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice. *Sci Rep* 2014; 4:4689.
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411(6837):613-617.
- Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* 2013; 140(22):4471-4479.
- Okabe M, Nagira M, Kawai Y, Matzno S, Mimura T, Mayumi T. A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona-free hamster eggs. *Fertil Steril* 1990; 54(6):1121-1126.
- Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, Sugita Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through the direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 1985; 260(17):9699-9705.
- Oko R. Occurrence and formation of cytoskeletal proteins in mammalian spermatozoa. *Andrologia* 1998; 30(4-5):193-206.

- Oko R, Hermo L, Chan PT, Fazel A, Bergeron JJ. The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. *J Cell Biol* 1993; 123(4):809-821.
- Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, Miller DA, Prasad V, Doetschman T, Paul RJ, Shull GE. Targeted ablation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J Biol Chem* 2004; 279(32):33742-33750.
- Oliveira RG, Tomasi L, Rovasio RA, Giojalas LC. Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *J Reprod Fertil* 1999; 115(1):23-27.
- Olson GE, Winfrey VP. Structure of acrosomal matrix domains of rabbit sperm. *J Struct Biol* 1994; 112(1):41-48.
- Olson SD, Fauci LJ, Suárez SS. Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation. *Mol Hum Reprod* 2011; 17(8):500-510.
- O'Neil GS, Conlon JM, Deacon CF, Thorndyke MC. Tachykinins in the central and peripheral nervous system of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Gen Comp Endocrinol* 1987; 66(3):314-322.
- Oren-Benaroya R, Orvieto R, Gakamsky A, Pinchasov M, Eisenbach M. The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod* 2008; 23(10):2339-23345.
- Organización Mundial de la Salud. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. 4th eEd. Cambridge University Press, 1999
- Ortega HH, Lorente JA, Mira GA, Baravalle C, Salvetti NR. Constant light exposure causes dissociation in gonadotrophin secretion and inhibits partially neuroendocrine differentiation of Leydig cells in adult rats. *Reprod Domest Anim* 2004; 39(6):417-423.
- Ortega HH, Salvetti NR, Baravalle C, Lorente JA, Mira GA. Oestradiol induced inhibition of neuroendocrine marker expression in Leydig cells of adult rats. *Reprod Domest Anim* 2006; 41(3):204-209.
- Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Álvarez J, Kopf GS. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(11):1017-1026.
- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 2004; 429(6988):154.
- Oszycka-Salut C, Díez F, Burdet J, Gervasi MG, Franchi A, Bianciotti LG, Davio C, Pérez-Martínez S. Cyclic AMP efflux, via MRPs and A1 adenosine receptors, is critical for bovine sperm capacitation. *Mol Hum Reprod* 2014; 20(1):89-99.

- Otani H, Tanaka O, Kasai K, Yoshioka T. Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: regular dispositions and synchronized changes. *Anat Rec* 1988; 222(1):26-33.
- O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* 2000; 11(5):1571-1584.
- Ouimet T, Facchinetti P, Rose C, Bonhomme MC, Gros C, Schwartz JC. Neprilysin II: A putative novel metalloprotease and its isoforms in CNS and testis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271(3):565-570.
- Page NM. Characterization of the gene structures, precursor processing and pharmacology of the endokinin peptides. *Vascul Pharmacol* 2006; 45(4):200-208.
- Page NM, Bell NJ, Gardiner SM, Manyonda IT, Brayley KJ, Strange PG, Lowry PJ. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(10):6245-6250.
- Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ, Manyonda IT, Lowry PJ. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature* 2000; 405(6788):797-800.
- Palanche T, Ilie B, Zoffmann S, Reck MP, Bucher B, Edelstein SJ, Galzi JL. The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states. *J Biol Chem* 2001; 276(37):34853-34861.
- Pampillo M, Camuso N, Taylor JE, Szereszewski JM, Ahow MR, Zajac M, Millar RP, Bhattacharya M, Babwah AV. Regulation of GPR54 signaling by GRK2 and {beta}-arrestin. *Mol Endocrinol* 2009; 23(12):2060-2074.
- Park JY, Ahn HJ, Gu JG, Lee KH, Kim JS, Kang HW, Lee JH. Molecular identification of Ca²⁺ channels in human sperm. *Exp Mol Med* 2003; 35(4):285-292.
- Parks JE, Ehrenwald E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. In *Controls of sperm motility: biological and clinical aspects*. CRC Press 1990 pp. 155-167.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38(5):1171-1188.
- Patak E, Candenas ML, Pennefather JN, Ziccone S, Lilley A, Martín JD, Flores C, Mantecón AG, Story ME, Pinto FM. Tachykinins and tachykinin receptors in human uterus. *Br J Pharmacol* 2003; 139(3):523-532.
- Patak E, Pennefather JN, Gozali M, Candenas L, Kerr K, Exintaris B, Ziccone S, Potteck H, Chetty N, Page NM, Pinto F. Functional characterisation of hemokinin-1 in mouse uterus. *Eur J Pharmacol* 2008; 601(1-3):148-153.

- Patak E, Pinto FM, Story ME, Pintado CO, Fleming A, Page NM, Pennefather JN, Candenas ML. Functional and molecular characterization of tachykinins and tachykinin receptors in the mouse uterus. *Biol Reprod* 2005; 72(5):1125-1133.
- Patel HJ, Ramkissoon SH, Patel PS, Rameshwar P. Transformation of breast cells by truncated neurokinin-1 receptor is secondary to activation by preprotachykinin-A peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(48):17436-17441.
- Pelletán LE, Suhaiman L, Vaquer CC, Bustos MA, De Blas GA, Vitale N, Mayorga LS, Belmonte SA. ADP ribosylation factor 6 (ARF6) promotes acrosomal exocytosis by modulating lipid turnover and Rab3A activation. *J Biol Chem* 2015; 290(15):9823-9841.
- Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci* 2004; 74(12):1445-1463.
- Pérez-Cerezales S, Boryshpolets S, Eisenbach M. Behavioral mechanisms of mammalian sperm guidance. *Asian J Androl* 2015; 17(4):628-632.
- Pierobon P, Kemali M, Milici N. Substance P and hydra: an immunohistochemical and physiological study. *Comp Biochem Physiol C* 1989; 92(2):217-221.
- Pike LJ. Rafts defined: A report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J Lipid Res* 2006; 47(7):1597-1598.
- Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 2012; 92(3):1235-1316.
- Pintado CO, Pinto FM, Pennefather JN, Hidalgo A, Baamonde A, Sánchez T, Candenas ML. A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function. *Biol Reprod* 2003; 69(3):940-946.
- Pinto FM, Armesto CP, Magraner J, Trujillo M, Martín JD, Candenas ML. Tachykinin receptor and neutral endopeptidase gene expression in the rat uterus: characterization and regulation in response to ovarian steroid treatment. *Endocrinology* 1999; 140(6):2526-2532.
- Pinto FM, Bello AR, Gallardo-Castro M, Valladares F, Almeida TA, Tena-Sempere M, Candenas L. Analysis of the expression of tachykinins and tachykinin receptors in the rat uterus during early pregnancy. *Biol Reprod* 2015; 93(2):51.
- Pinto FM, Cintado CG, Devillier P, Candenas ML. Expression of preprotachykinin-B, the gene that encodes neurokinin B, in the rat uterus. *Eur J Pharmacol* 2001; 425(2):R1-2.
- Pinto FM, Pintado CO, Pennefather JN, Patak E, Candenas L. Ovarian steroids regulate tachykinin and tachykinin receptor gene expression in the mouse uterus. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:77.

- Pocognoni CA, Berberían MV, Mayorga LS. ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) machinery is essential for acrosomal exocytosis in human sperm. *Biol Reprod* 2015; 93(5):124.
- Pollard JW, Plante C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suárez SS. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* 1991; 44(1):102-107.
- Pyenta PS, Holowka D, Baird B. Cross-correlation analysis of inner-leaflet-anchored green fluorescent protein co-redistributed with IgE receptors and outer leaflet lipid raft components. *Biophys J* 2001; 80(5):2120-2132.
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Kaprivinsky L, Kirichof Y, Ramsey IS, Quill TA, Clapham DE. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(4):1219-1223.
- Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL. A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(22):12527-12531.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(25):14869-14874.
- Ralt D, Goldenberg M, Fetterolf P, Thompson D, Dor J, Mashiach S, Garbers DL, Eisenbach M. Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(7):2840-2844.
- Ralt D, Manor M, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Ben-Shlomo I, Makler A, Yuli I, Dor J, Blumberg S, Mashiach S, Eisenbach M. Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol Reprod* 1994; 50(4):774-785.
- Ramalho-Santos J, Schatten G. Presence of N-ethyl maleimide sensitive factor (NSF) on the acrosome of mammalian sperm. *Arch Androl* 2004; 50(3):163-168.
- Ramaswamy S, Guerriero KA, Gibbs RB, Plant TM. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 2008; 149(9):4387-4395.
- Ramaswamy S, Seminara SB, Ali B, Ciofi P, Amin NA, Plant TM. Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 2010; 151(9):4494-4503.
- Ramaswamy S, Seminara SB, Pohl CR, DiPietro MJ, Crowley WF Jr, Plant TM. Effect of continuous intravenous administration of human metastatin 45-54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 2007; 148(7):3364-3370.

- Ramzan F, Qureshi IZ. Intraperitoneal kisspeptin-10 administration induces dose-dependent degenerative changes in maturing rat testes. *Life Sci* 2011; 88(5-6):246-256.
- Ramzan F, Qureshi IZ, Khan MA, Iqbal MJ. Pretreatment with GnRH antagonist causes partial restoration of testicular tissue after Kisspeptin-10 induced degeneration in prepubertal rats. *Pak J Zool* 2013; 45:817-832.
- Ramzan MH, Ramzan M, Ramzan F, Wahab F, Jelani M, Khan MA, Shah M. Insight into the serum kisspeptin levels in infertile males. *Arch Iran Med* 2015; 18(1):12-17.
- Rance NE. Menopause and the human hypothalamus: evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback. *Peptides* 2009; 30(1):111-122.
- Rance NE, Krajewski SJ, Smith MA, Cholanian M, Dacks PA. Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Res* 2010; 1364:116-128.
- Rannikki AS, Zhang FP, Huhtaniemi IT. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 107(2):199-208.
- Rao JN, Debeljuk L, Bartke A. Effects of tachykinins on the secretory activity of rat Sertoli cells in vitro. *Endocrinology* 1995; 136(3):1315-1318.
- Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod* 2001; 65(2):462-470.
- Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839(3):155-168.
- Regoli D, Boudon A, Fauchère JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* 1994; 46(4):551-599.
- Ren D, Navarro B, Pérez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001; 413(6856):603-609.
- Ren D, Xia J. Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda)* 2010; 25(3):165-175.
- Ringel MD, Hardy E, Bernet VJ, Burch HB, Schuppert F, Burman KD, Saji M. Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(5):2399.
- Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 2004; 70(2):518-522.
- Robert M, Gagnon C. Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(6-7):944-960.

- Roberts KD. Sterol sulfates in the epididymis; synthesis and possible function in the reproductive process. *J Steroid Biochem* 1987; 27(1-3):337-341.
- Rodríguez-Martínez H, Ekstedt E, Einarsson S. Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int J Androl* 1990; 13(3):238-243.
- Roggero CM, De Blas GA, Dai H, Tomes CN, Rizo J, Mayorga LS. Complexin/synaptotagmin interplay controls acrosomal exocytosis. *J Biol Chem* 2007; 282(36):26335-26343.
- Roggero CM, Tomes CN, De Blas GA, Castillo J, Michaut MA, Fukuda M, Mayorga LS. Protein kinase C-mediated phosphorylation of the two polybasic regions of synaptotagmin VI regulates their function in acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 2005; 285(2):422-435.
- Rojas FJ, Moretti-Rojas I. Involvement of the calcium-specific protease, calpain, in the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Int J Androl* 2000; 23(3):163-168.
- Roldán ER, Murase T, Shi QX. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 1994; 266(5190):1578-1581.
- Rolland AD, Jégou B, Pineau C. Testicular development and spermatogenesis: harvesting the postgenomics bounty. *Adv Exp Med Biol* 2008; 636:16-41.
- Romero MF, Boron WF. Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: cloning and physiology. *Annu Rev Physiol* 1999; 61:699-723.
- Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko ML, Rance NE. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(7):2744-2750.
- Rosenkilde MM, Cahir M, Gether U, Hjorth SA, Schwartz TW. Mutations along transmembrane segment II of the NK-1 receptor affect substance P competition with non-peptide antagonists but not substance P binding. *J Biol Chem* 1994; 269(45):28160-28164.
- Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, Gottsch ML, Tena-Sempere M, Moenter SM, Terasawa E, Clarke IJ, Steiner RA, Millar RP. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci* 2009; 29(12):3920-3929.
- Rotem R, Paz GF, Homonnai ZT, Kalina M, Naor Z. Protein kinase C is present in human sperm: possible role in flagellar motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990a; 87(18):7305-7308.
- Rotem R, Paz GF, Homonnai ZT, Kalina M, Naor Z. Further studies on the involvement of protein kinase C in human sperm flagellar motility. *Endocrinology* 1990b; 127(5):2571-2577.
- Rotman T, Etkovitz N, Spiegel A, Rubinstein S, Breitbart H. Protein kinase A and protein kinase C(alpha)/PPP1CC2 play opposing roles in the

- regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activation in bovine sperm. *Reproduction* 2010; 140(1):43-56.
- Roy SC, Atreja SK. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2008; 107(1-2):68-84.
- Ruiz-Pino F, García-Galiano D, Manfredi-Lozano M, León S, Sánchez-Garrido MA, Roa J, Pinilla L, Navarro VM, Tena-Sempere M. Effects and interactions of tachykinins and dynorphin on FSH and LH secretion in developing and adult rats. *Endocrinology* 2015; 156(2):576-588.
- Sagan S, Chassaing G, Pradier L, Lavielle S. Tachykinin peptides affect differently the second messenger pathways after binding to CHO-expressed human NK-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276(3):1039-1048.
- Sakata Y, Saegusa H, Zong S, Osanai M, Murakoshi T, Shimizu Y, Noda T, Aso T, Tanabe T. Analysis of Ca(2+) currents in spermatocytes from mice lacking Ca(v)2.3 (alpha1E) Ca(2+) channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288(4):1032-1036.
- Sakata Y, Saegusa H, Zong S, Osanai M, Murakoshi T, Shimizu Y, Noda T, Aso T, Tanabe T. Ca(v)2.3 (alpha1E) Ca²⁺ channel participates in the control of sperm function. *FEBS Lett* 2002; 516(1-3):229-233.
- Salehi S, Adeshina I, Chen H, Zirkin BR, Hussain MA, Wondisford F, Wolfe A, Radovick S. Developmental and endocrine regulation of kisspeptin expression in mouse Leydig cells. *Endocrinology* 2015; 156(4):1514-1522.
- Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65:245-259.
- San Agustín JT, Witman GB. Role of cAMP in the reactivation of demembranated ram spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton* 1994; 27(3):206-218.
- Sánchez-Carranza O, Torres-Rodríguez P, Darszon A, Treviño CL, López-González I. Pharmacology of hSlo3 channels and their contribution in the capacitation-associated hyperpolarization of human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 466(3):554-559.
- Sandoval-Guzmán T, Rance NE. Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. *Brain Res* 2004; 1026(2):307-312.
- Santi CM, Martínez-López P, De la Vega-Beltrán JL, Butler A, Alisio A, Darszon A, Salkoff L. The SL03 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett* 2010; 584(5):1041-1046.
- Sastry BV, Janson VE, Owens LK. Significance of substance P- and enkephalin-peptide systems in the male genital tract. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 632:339-353.

- Satake H, Kawada T. Overview of the primary structure, tissue-distribution, and functions of tachykinins and their receptors. *Curr Drug Targets* 2006; 7(8):963-974.
- Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUM01. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 21):4985-4990.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002; 129(15):3533-3544.
- Schlingmann K, Michaut MA, McElwee JL, Wolff CA, Travis AJ, Turner RM. Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. *J Androl* 2007; 28(5):706-716.
- Schmidlin F, Roosterman D, Bunnnett NW. The third intracellular loop and carboxyl tail of neurokinin 1 and 3 receptors determine interactions with beta-arrestins. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285(4):C945-958.
- Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschu K, Liebermann J, Williams JC, Armesilla AL, Emerson M, Oceandy D, Knobeloch KP, Neyses L. Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem* 2004; 279(27):28220-28226.
- Schulze W, Davidoff MS, Holstein AF. Are Leydig cells of neural origin? Substance P-like immunoreactivity in human testicular tissue. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1987; 115(3):373-377.
- Selvaraj V, Asano A, Buttke DE, McElwee JL, Nelson JL, Wolff CA, Merdushev T, Fornés MW, Cohen AW, Lisanti MP, Rothblat GH, Kopf GS, Travis AJ. Segregation of micron-scale membrane sub-domains in live murine sperm. *J Cell Physiol* 2006; 206(3):636-646.
- Selvaraj V, Buttke DE, Asano A, McElwee JL, Wolff CA, Nelson JL, Klaus AV, Hunnicutt GR, Travis AJ. GM1 dynamics as a marker for membrane changes associated with the process of capacitation in murine and bovine spermatozoa. *J Androl* 2007; 28(4):588-599.
- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003; 349(17):1614-1627.
- Serrano CJ, Treviño CL, Félix R, Darszon A. Voltage-dependent Ca(2+) channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett* 1999; 462(1-2):171-176.
- Severini C, Improta G, Falconieri-Ersamer G, Salvadori S, Ersamer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev* 2002; 5(2)4:285-322.

- Shadan S, James PS, Howes EA, Jones R. Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod* 2004; 71(1):253-265.
- Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(4):529-536.
- Shi QX, Roldán ER. Bicarbonate/CO₂ is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biol Reprod* 1995; 52(3):540-546.
- Shimada K, Takahashi M, Turner AJ, Tanzawa K. Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11. *Biochem J* 1996; 315(Pt 3):863-867.
- Shimizu Y, Matsuyama H, Shiina T, Takewaki T, Furness JB. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(2):295-311.
- Shintani Y, Nishimura J, Niino N, Hirano K, Nakano H, Kanaide H. Mechanisms underlying the neurokinin A-induced contraction of the pregnant rat myometrium. *Br J Pharmacol* 2000; 130(5):1165-1173.
- Si Y, Okuno M. Regulation of microtubule sliding by a 36-kDa phosphoprotein in hamster sperm flagella. *Mol Reprod Dev* 1999; 52(3):328-334.
- Siems WE, Maul B, Wiesner B, Becker M, Walther T, Rothe L, Winkler A. Effects of kinins on mammalian spermatozoa and the impact of peptidolytic enzymes. *Andrologia* 2003; 35(1):44-54.
- Signorelli JR, Diaz ES, Fara K, Barón L, Morales P. Protein phosphatases decrease their activity during capacitation: a new requirement for this event. *PLoS One* 2013; 8(12):e81286.
- Simpson KL, Holmes CH. Differential expression of complement regulatory proteins decay-accelerating factor (CD55), membrane cofactor protein (CD46) and CD59 during human spermatogenesis. *Immunology* 1994; 81(3):452-461.
- Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175(4023):720-731.
- Sion B, Grizard G, Boucher D. Quantitative analysis of desmosterol, cholesterol and cholesterol sulfate in semen by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 2001; 935(1-2):259-265.
- Skalhegg BS, Huang Y, Su T, Idzerda RL, McKnight GS, Burton KA. Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol Endocrinol* 2002; 16(3):630-639.
- Sleight SB, Miranda PV, Plaskett NW, Maier B, Lysiak J, Scrable H, Herr JC, Visconti PE. Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation

- of lipid rafts during capacitation. *Biol Reprod* 2005; 73(4):721-729.
- Sliwa L. Substance P and beta-endorphin act as possible chemoattractants of mouse sperm. *Arch Androl* 2001; 46(2):135-140.
- Smith GD, Wolf DP, Trautman KC, da Cruz e Silva EF, Greengard P, Vijayaraghavan S. Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility. *Biol Reprod* 1996; 54(3):719-727.
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005; 146(9):3686-3692.
- Smith TT, Koyanagi F, Yanagimachi R. Distribution and number of spermatozoa in the oviduct of the golden hamster after mating and artificial insemination. *Biol Reprod* 1987; 37(1):225-234.
- Sosa CM, Pavarotti MA, Zanetti MN, Zoppino FC, De Blas GA, Mayorga LS. Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. *Mol Hum Reprod* 2015; 21(3):244-254.
- Sosa CM, Zanetti M, Pocognoni CA, Mayorga LS. Acrosomal swelling is triggered by cAMP downstream of the opening of store-operated calcium channels during acrosomal exocytosis in human sperm. *Biol Reprod* 2016; 94(3):57.
- Sosnik J, Miranda PV, Spiridonov NA, Yoon SY, Fissore RA, Johnson GR, Visconti PE. Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 15):2741-2749.
- Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK, Hatt H. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* 2003; 299(5615):2054-2058.
- Spehr M, Schwane K, Riffell JA, Barbour J, Zimmer RK, Neuhaus EM, Hatt H. Particulate adenylate cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis. *J Biol Chem* 2004; 279(38):40194-40203.
- Spehr M, Schwane K, Riffell JA, Zimmer RK, Hatt H. Odorant receptors and olfactory-like signaling mechanisms in mammalian sperm. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250(1-2):128-136.
- Spratt DI, Carr DB, Merriam GR, Scully RE, Rao PN, Crowley WF Jr. The spectrum of abnormal patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: clinical and laboratory correlations. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64(2):283-291.
- Stafford LJ, Xia C, Ma W, Cai Y, Liu M. Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. *Cancer Res* 2002; 62(19):5399-5404.
- Stival C, La Spina FA, Baró Graf C, Arcelay E, Arranz SE, Ferreira JJ, Le Grand S, Dzikunu VA, Santi CM, Visconti PE, Buffone MG, Krapf D.

- Src kinase is the connecting player between protein kinase A (PKA) activation and hyperpolarization through SLO3 potassium channel regulation in mouse sperm. *J Biol Chem* 2015; 290(30):18855-18864.
- Strott CA, Higashi Y. Cholesterol sulfate in human physiology: what's it all about? *J Lipid Res* 2003; 44(7):1268-1278.
- Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature* 2011; 471(7338):382-386.
- Suárez SS. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 2008a; 52(5-6):455-462.
- Suárez SS. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* 2008b; 14(6):647-657.
- Suárez SS, Dai XB, DeMott RP, Redfern K, Mirando MA. Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *J Androl* 1992; 13(1): 75-80.
- Suárez SS, Katz DF, Overstreet W. Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biol Reprod* 1983; 29(5):1277-1287.
- Suárez SS, Osman RA. Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol Reprod* 1987; 36(5):1191-1198.
- Suárez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 2006; 12(1):23-37.
- Suárez SS, Varosi SM, Dai X. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(10):4660-4664.
- Suárez SS, Vincenti L, Ceglia MW. Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *J Exp Zool* 1987; 244(2):331-336.
- Subirán N, Agirregoitia E, Valdivia A, Ochoa C, Casis L, Irazusta J. Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. *Fertil Steril* 2008; 89(5 Suppl):1571-1577.
- Subirán N, Candenás L, Pinto FM, Cejudo-Román A, Agirregoitia E, Irazusta J. Autocrine regulation of human sperm motility by the met-enkephalin opioid peptide. *Fertil Steril* 2012; 98(3):617-625.
- Subirán N, Casis L, Irazusta J. Regulation of male fertility by the opioid system. *Mol Med* 2011; 17(7-8):846-853.
- Subirán N, Pinto FM, Agirregoitia E, Candenás L, Irazusta J. Control of APN/CD13 and NEP/CD10 on sperm motility. *Asian J Androl* 2010; 12(6):899-902.

- Suman-Chauhan N, Guard S, Williams BJ, Watling KJ. Pharmacological characterization of tachykinin-stimulated inositol phospholipid hydrolysis in peripheral tissues. *Br J Pharmacol* 1990; 101(4):1001-1005.
- Sun F, Bahat A, Gakamsky A, Girsh E, Katz N, Giojalas LC, Tur-Kaspa I, Eisenbach M. Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum Reprod* 2005; 20(3):761-767.
- Sun F, Giojalas LC, Rovasio RA, Tur-Kaspa I, Sánchez R, Eisenbach M. Lack of species-specificity in mammalian sperm chemotaxis. *Dev Biol* 2003; 255(2):423-427.
- Suzuki F, Yanagimachi R. Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Res* 1989; 23(3):335-347.
- Swerdloff RS, Wang C, Bhasin S. Developments in the control of testicular function. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1992; 6(2):451-483.
- Szereszewski JM, Pampillo M, Ahow MR, Offermanns S, Bhattacharya M, Babwah AV. GPR54 regulates ERK1/2 activity and hypothalamic gene expression in a $G\alpha(q/11)$ and β -arrestin-dependent manner. *PLoS One* 2010; 5(9):e12964.
- Taban CH, Cathieni M. Localization of substance P-like immunoreactivity in Hydra. *Experientia* 1979; 35(6):811-812.
- Takano H, Yanagimachi R, Urch UA. Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma: inhibitor studies using the golden hamster. *Zygote* 1993; 1(1):79-91.
- Tamba S, Yodoi R, Segi-Nishida E, Ichikawa A, Narumiya S, Sugimoto Y. Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(38):14539-14544.
- Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* 2001; 65(3):784-792.
- Tardif S, Wilson MD, Wagner R, Hunt P, Gertsenstein M, Nagy A, Lobe C, Koop BF, Hardy DM. Zonadhesin is essential for species specificity of sperm adhesion to the egg zona pellucida. *J Biol Chem* 2010; 285(32):24863-24870.
- Tariq AR, Shabab M. Effect of kisspeptin challenge on testosterone and inhibin secretion from in vitro testicular tissue of adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Andrologia* 2017; 49(1):1-7.
- Tariq AR, Shahab M, Clarke IJ, Pereira A, Smith JT, Khan SH, Sultan J, Javed S, Anwar T. Kiss1 and Kiss1 receptor expression in the rhesus monkey testis: a possible local regulator of testicular function. *Cent Eur J Biol* 2013; 8(10):968-974.

- Tash JS. Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil Cytoskeleton* 1989; 14(3):332-339.
- Tash JS, Bracho GE. Identification of phosphoproteins coupled to initiation of motility in live epididymal mouse sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251(2):557-563.
- Tash JS, Hidaka H, Means AR. Axokinin phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase is sufficient for activation of sperm flagellar motility. *J Cell Biol* 1986; 103(2):649-655.
- Tash JS, Means AR. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* 1983; 28(1):75-104.
- Tatemoto K, Lundberg JM, Jörnvall H, Mutt V. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 128(2):947-953.
- Teves ME, Barbano F, Guidobaldi HA, Sánchez R, Miska W, Giojalas LC. Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil Steril* 2006; 86(3):745-749.
- Teves ME, Guidobaldi HA, Uñates DR, Sánchez R, Miska W, Publicover SJ, Morales García AA, Giojalas LC. Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One* 2009; 4(12):e8211.
- Therien I, Soubeyrand S, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod* 1997; 57(5):1080-1088.
- Thompson EL, Amber V, Stamp GW, Patterson M, Curtis AE, Cooke JH, Appleby GF, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR, Murphy KG. Kisspeptin-54 at high doses acutely induces testicular degeneration in adult male rats via central mechanisms. *Br J Pharmacol* 2009; 156(4):609-625.
- Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, Bewick GA, Stamp GW, Curtis AE, Cooke JH, Jethwa PH, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR. Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291(5):E1074-1082.
- Tindall DJ, Mena CR, Means AR. Hormonal regulation of androgen-binding protein in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 1978; 103(2):589-594.
- Tomes CN. The proteins of exocytosis: lessons from the sperm model. *Biochem J* 2015; 465(3):359-370.
- Tomikawa J, Homma T, Tajima S, Shibata T, Inamoto Y, Takase K, Inoue N, Ohkura S, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H. Molecular characterization and estrogen regulation of hypothalamic KISS1 gene in the pig. *Biol Reprod* 2010; 82(2):313-319.
- Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B,

- O'Rahilly S, Semple RK. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009; 41(3):354-358.
- Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, Gurbuz F, Temiz F, Millar RP, Yuksel B. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 2012; 366(7):629-635.
- Torrens Y, Beaujouan JC, Saffroy M, Glowinski J. Involvement of septide-sensitive tachykinin receptors in inositol phospholipid hydrolysis in the rat urinary bladder. *Peptides* 1995; 16(4):587-594.
- Touhara K, Sengoku S, Inaki K, Tsuboi A, Hirono J, Sato T, Sakano H, Haga T. Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(7):4040-4045.
- Toyoda Y, Yokohama M, Hoshi T. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. *Jpn J Anim Reprod* 1971; 16:147-157.
- Travis AJ, Kopf GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 2002; 110(6):731-736.
- Travis AJ, Merdushev T, Vargas LA, Jones BH, Purdon MA, Nipper RW, Galatioto J, Moss SB, Hunnicutt GR, Kopf GS. Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and guinea pig spermatozoa. *Dev Biol* 2001; 240(2):599-610.
- Treviño CL, Félix R, Castellano LE, Gutierrez C, Rodríguez D, Pacheco J, López-González I, Gomora JC, Tsutsumi V, Hernández-Cruz A, Fiordelisio T, Scaling AL, Darszon A. Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca(2+) channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett* 2004; 563(1-3):87-92.
- Treviño CL, Santi CM, Beltrán C, Hernández-Cruz A, Darszon A, Lomeli H. Localisation of inositol trisphosphate and ryanodine receptors during mouse spermatogenesis: possible functional implications. *Zygote* 1998; 6(2):159-172.
- Treviño CL, Serrano CJ, Beltrán C, Félix R, Darszon A. Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Letters* 2001; 509(1):119-125.
- Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18(1-2):25-38.
- Turner TT, Reich GW. Cauda epididymal sperm motility: a comparison among five species. *Biol Reprod* 1985; 32(1):120-128.
- Uenoyama Y, Inoue N, Pheng V, Homma T, Takase K, Yamada S, Ajiki K, Ichikawa M, Okamura H, Maeda KI, Tsukamura H. Ultrastructural evidence of kisspeptin-gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) interaction in the median eminence of female rats: implication of

- axo-axonal regulation of GnRH release. *J Neuroendocrinol* 2011; 23(10):863-870.
- Urner F, Leppens-Luisier G, Sakkas D. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biol Reprod* 2001; 64(5):1350-1357.
- Van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod* 2005b; 11(8):583-590.
- Van Gestel RA, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM. Effects of methyl-beta-cyclodextrin-mediated cholesterol depletion in porcine sperm compared to somatic cells. *Mol Reprod Dev* 2005a; 72(3):386-395.
- Van Kuijk FJ, Handelman GJ, Dratz EA. Consecutive action of phospholipase A2 and glutathione peroxidase is required for reduction of phospholipid hydroperoxides and provides a convenient method to determine peroxide values in membranes. *J Free Radic Biol Med* 1985; 1(5-6):421-427.
- Vandevoort CA, Tollner TL, Overstreet JW. Separate effects of caffeine and dbcAMP on macaque sperm motility and interaction with the zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 1994; 37(3):299-304.
- Varano G, Lombardi A, Cantini G, Forti G, Baldi E, Luconi M. Src activation triggers capacitation and acrosome reaction but not motility in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2008; 23(12):2652-2662.
- Varma SK, Bloch E, Gondos B, Rossi V, Gunsalus GL, Thysen B. Reproductive toxicity of 2,4-toluenediamine in the rat. 3. Effects on androgen-binding protein levels, selected seminiferous tubule characteristics, and spermatogenesis. *J Toxicol Environ Health* 1988; 25(4):435-451.
- Veitinger T, Riffell JR, Veitinger S, Nascimento JM, Triller A, Chandsawangbhuwana C, Schwane K, Geerts A, Wunder F, Berns MW, Neuhaus EM, Zimmer RK, Spehr M, Hatt H. Chemosensory Ca²⁺ dynamics correlate with diverse behavioral phenotypes in human sperm. *J Biol Chem* 2011; 286(19):17311-17325.
- Verkleij AJ, Zwaal RF, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, Van Deenen LL. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1973; 323(2):178-193.
- Vicari E, Mongioi A, Calogero AE, Moncada ML, Sidoti G, Polosa P, D'Agata R. Therapy with human chorionic gonadotrophin alone induces spermatogenesis in men with isolated hypogonadotrophic hypogonadism—long-term follow-up. *Int J Androl* 1992; 15(4):320-329.
- Vijayaraghavan S, Goueli SA, Davey MP, Carr DW. Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility. *J Biol Chem* 1997a; 272(8):4747-4752.

- Vijayaraghavan S, Olson GE, NagDas S, Winfrey VP, Carr DW. Subcellular localization of the regulatory subunits of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase in bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 1997b; 57(6):1517-1523.
- Vijayaraghavan S, Stephens DT, Trautman K, Smith GD, Khatra B, Da Cruz e Silva EF, Greengard P. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. *Biol Reprod* 1996; 54(3):709-718.
- Villanueva-Díaz C, Arias-Martínez J, Bermejo-Martínez L, Vadillo-Ortega F. Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertil Steril* 1995; 64(6):1183-1188.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995b; 121(4):1129-1137.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Álvarez JG, Kopf GS. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. Beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem* 1999a; 274(5):3235-3242.
- Visconti PE, Krapf D, De la Vega-Beltrán JL, Acevedo JJ, Darszon A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl* 2011; 13(3):395-405.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 1995a; 121(4):1139-1150.
- Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Álvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 1999b; 214(2):429-443.
- Visconti PE, Stewart-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf GS, Tezón JG. Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod* 1999c; 61(1):76-84.
- Visconti PE, Tezón JG. Phorbol esters stimulate cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation in hamster spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol Reprod* 1989; 40(2):223-231.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 2002; 53(1-2):133-150.
- Von Euler US, Gaddum GH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 1931; 72(1):74-87.

- Wacker JL, Feller DB, Tang XB, DeFino MC, Namkung Y, Lyssand JS, Mhyre AJ, Tan X, Jensen JB, Hague C. Disease-causing mutation in GPR54 reveals the importance of the second intracellular loop for class A G-protein-coupled receptor function. *J Biol Chem* 2008; 283(45):31068-31078.
- Wahab F, Atika B, Shahab M, Behr R. Kisspeptin signalling in the physiology and pathophysiology of the urogenital system. *Nat Rev Urol* 2016; 13(1):21-32.
- Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K, Steiner RA, Okamura H. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 2010; 30(8):3124-3132.
- Wakabayashi Y, Yamamura T, Sakamoto K, Mori Y, Okamura H. Electrophysiological and morphological evidence for synchronized GnRH pulse generator activity among Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin A (KNDy) neurons in goats. *J Reprod Dev* 2013; 59(1):40-48.
- Walensky LD, Snyder SH. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol* 1995; 130(4):857-869.
- Wang D, Hu J, Bobulescu IA, Quill TA, McLeroy P, Moe OW, Garbers DL. A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(22):9325-9330.
- Wang H, Liu J, Cho KH, Ren D. A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biol Reprod* 2009; 81(3):539-544.
- Wang JY, Hsu MC, Tseng TH, Wu LS, Yang KT, Chiu CH. Kisspeptin expression in mouse Leydig cells correlates with age. *J Chin Med Assoc* 2015; 78(4):249-257.
- Wang L, Besserra C, Garbers DL. A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asymmetry and normal fertilization. *Dev Biol* 2004; 267(1):203-215.
- Warner FJ, Liu L, Lubowski DZ, Burcher E. Circular muscle contraction, messenger signalling and localization of binding sites for neurokinin A in human sigmoid colon. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27(11):928-933.
- Watanabe H, Kondoh G. Mouse sperm undergo GPI-anchored protein release associated with lipid raft reorganization and acrosome reaction to acquire fertility. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 15):2573-2581.
- Waterman MR, Keeney DS. Genes involved in androgen biosynthesis and the male phenotype. *Horm Res* 1992; 38(5-6):217-221.

- Wennemuth G, Babcock DF, Hille B. Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *J Gen Physiol* 2003b; 122(1):115-128.
- Wennemuth G, Carlson AE, Harper AJ, Babcock DF. Bicarbonate actions on flagellar and Ca^{2+} -channel responses: initial events in sperm activation. *Development* 2003a; 130(7):1317-1326.
- Wennemuth G, Westenbroek RE, Xu T, Hille B, Babcock DF. $\text{Ca}_v2.2$ and $\text{Ca}_v2.3$ (N- y R-type) Ca^{2+} channels in depolarization-evoked entry of Ca^{2+} into mouse sperm. *J Biol Chem* 2000; 275(28):21210-21217.
- Wertheimer E, Krapf D, De la Vega-Beltrán JL, Sánchez-Cárdenas C, Navarrete F, Haddad D, Escoffier J, Salicioni AM, Levin LR, Buck J, Mager J, Darszon A, Visconti PE. Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *J Biol Chem* 2013; 288(49):35307-35320.
- Wertheimer EV, Salicioni AM, Liu W, Treviño CL, Chávez J, Hernández-González EO, Darszon A, Visconti PE. Chloride is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 2008; 283(51):35539-35550.
- West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE. Chromosome localization and genomic structure of the KISS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* 1998; 54(1):145-148.
- Westenbroek RE, Babcock DF. Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel $\alpha 1$ subunits in sperm. *Dev Biol* 1999; 207(2):457-469.
- Wheatley M, Hawtin SR. Glycosilation of G-protein-coupled receptors for hormones central to normal reproductive functioning: its occurrence and role. *Hum Reprod Update* 1999; 5(4): 356-364.
- White D, De Lamirande E, Gagnon C. Protein kinase C is an important signaling mediator associated with motility of intact sea urchin spermatozoa. *J Exp Biol* 2007; 210(Pt 22):4053-4064.
- Whitehead TL, McNair SD, Hadden CE, Young JK, Hicks RP. Membrane-induced secondary structures of neuropeptides: a comparison of the solution conformations adopted by agonists and antagonists of the mammalian tachykinin NK1 receptor. *J Med Chem* 1998; 41(9):1497-1506.
- Whyteside AR, Turner AJ. Human neprilysin-2 (NEP2) and NEP display distinct subcellular localisations and substrate preferences. *FEBS Lett* 2008; 582(16):2382-2386.
- Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I. Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{2+} entry into sperm. *J Cell Biol* 1998; 142(2):473-484.
- Wolf DE, Hagopian SS, Ishijima S. Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *J Cell Biol* 1986; 102(4):1372-1377.

- Wolf DP, Vandevoort CA, Meyer-Hass GR, Zelinski-Wooten MB, Hess DL, Baughman WL, Stouffer RL. In vitro fertilization and embryo transfer in the Rhesus monkey. *Biol Reprod* 1989; 41(2):335-346.
- Wolfe CA, James PS, Mackie AR, Ladha S, Jones R. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59(6):1506-1514.
- Wolkowicz MJ, Digilio L, Klotz K, Shetty J, Flickinger CJ, Herr JC. Equatorial segment protein (ESP) is a human alloantigen involved in sperm-egg binding and fusion. *J Androl* 2008; 29(3):272-282.
- Wolkowicz MJ, Shetty J, Westbrook A, Klotz K, Jayes F, Mandal A, Flickinger CJ, Herr JC. Equatorial segment protein defines a discrete acrosomal subcompartment persisting throughout acrosomal biogenesis. *Biol Reprod* 2003; 69(3):735-745.
- Woo AL, James PF, Lingrel JB. Roles of the Na,K-ATPase α 4 isoform and the Na⁺/H⁺ exchanger in sperm motility. *Mol. Reprod. Dev* 2002; 62(3):348-356.
- Wuttke MS, Buck J, Levin LR. Bicarbonate-regulated soluble adenylyl cyclase. *J Pancreas* 2001; 2(Suppl. 4):154-158.
- Wykes SM, Visscher DW, Krawetz SA. Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1997; 3(1):15-19.
- Xia J, Ren D. Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels. *Biol Reprod* 2009; 80(6):1092-1098.
- Xie F, García MA, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, Jaiswal BS, Gossen JA, Espósito D, Van Duin M, Conti M. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol* 2006; 296(2):353-362.
- Yamagata K, Murayama K, Okabe M, Toshimori K, Nakanishi T, Kashiwabara S, Baba T. Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *J Biol Chem* 1998; 273(17):10470-10474.
- Yamane J. The proteolytic action of mammalian spermatozoa and its bearing upon the second maturation division of ova. *Cytologia* 1930; 1:349-403.
- Yan C, Wang H, Boyd DD. KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha -induced block of p65/p50 nuclear translocation. *J Biol Chem* 2001; 276(2):1164-1172.
- Yanagimachi R. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization related phenomena in the hamster. *Gamete Res* 1982; 5:323-344.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: The physiology of reproduction. Raven press 1994 pp. 189-317.
- Yanagimachi R. Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? *Biol Reprod* 2011; 85(1):4-5.

- Yao Y, Ho P, Yeung WS. Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000; 73(4):680-686.
- Yeo SH, Herbison AE. Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology* 2011; 152(6):2387-2399.
- Yi YJ, Manandhar G, Oko RJ, Breed WG, Sutovsky P. Mechanism of sperm-zona pellucida penetration during mammalian fertilization: 26S proteasome as a candidate egg coat lysin. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 63:385-408.
- Yi YJ, Manandhar G, Sutovsky M, Zimmerman SW, Jonáková V, Van Leeuwen FW, Oko R, Park CS, Sutovsky P. Interference with the 19S proteasomal regulatory complex subunit PSMD4 on the sperm surface inhibits sperm-zona pellucida penetration during porcine fertilization. *Cell Tissue Res* 2010; 341(2):325-340.
- Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 2000; 14(7):1053-1063.
- Yoon SY, Eum JH, Lee JE, Lee HC, Kim YS, Han JE, Won HJ, Park SH, Shim SH, Lee WS, Fissore RA, Lee DR, Yoon TK. Recombinant human phospholipase C zeta 1 induces intracellular calcium oscillations and oocyte activation in mouse and human oocytes. *Hum Reprod* 2012; 27(6):1768-1780.
- Yoon SY, Fissore RA. Release of phospholipase C zeta and [Ca²⁺]_i oscillation-inducing activity during mammalian fertilization. *Reproduction* 2007; 134(5):695-704.
- Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, Lee HC, Yoo MS, Coward K, Parrington J, Grow D, Cibelli JB, Visconti PE, Mager J, Fissore RA. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca(2+) release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest* 2008; 118(11):3671-3681.
- Young C, Grasa P, Coward K, Davis LC, Parrington J. Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. *Fertil Steril* 2009; 91(5 Suppl):2230-2242.
- Young JK, Anklin C, Hicks RP. NMR and molecular modeling investigations of the neuropeptide substance P in the presence of 15 mM sodium dodecyl sulfate micelles. *Biopolymers* 1994; 34(11):1449-1462.
- Young RJ, Bodt BA. Development of computer directed methods for the identification of hyperactivated motion using motion patterns developed by rabbit sperm during incubation under capacitating conditions. *J Androl* 1994; 15:362-377.
- Yudin AI, Goldberg E, Robertson KR, Overstreet JW. Calpain and calpastatin are located between the plasma membrane and outer acrosomal membrane of cynomolgus macaque spermatozoa. *J Androl* 2000; 21(5):721-729.

- Zamir N, Riven-Kreitman R, Manor M, Makler A, Blumberg S, Ralt D, Eisenbach M. Atrial natriuretic peptide attracts human spermatozoa in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197(1):116-122.
- Zanetti N, Mayorga LS. Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biol Reprod* 2009; 81(2):396-405.
- Zaneveld LJ, Srivastava PN, Williams WL. Relationship of a trypsin-like enzyme in rabbit spermatozoa to capacitation. *J Reprod Fertil* 1969; 20(2):337-339.
- Zarelli VE, Ruete MC, Roggero CM, Mayorga LS, Tomes CN. PTP1B dephosphorylates N-ethylmaleimide-sensitive factor and elicits SNARE complex disassembly during human sperm exocytosis. *J Biol Chem* 2009; 284(16):10491-104503.
- Zeng XH, Yang C, Kim ST, Lingle CJ, Xia XM. Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K⁺ current in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(14):5879-5884.
- Zeng Y, Clark EN, Florman HM. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* 1995; 171(2):554-563.
- Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, Paige CJ. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat immunol* 2000; 1(5):392-397.
- Zuccarello D, Ferlin A, Garolla A, Menegazzo M, Perilli L, Ambrosini G, Foresta C. How the human spermatozoa sense the oocyte: a new role of SDF1-CXCR4 signalling. *Int J Androl* 2011; 34(6 Pt 2):e554-65.

